



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *DDX41* E *STING* EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA
2021**

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *DDX41* E *STING* EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S184a Sampaio, Letícia Rodrigues.

Avaliação dos níveis de expressão dos genes DDX41 e STING em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica / Letícia Rodrigues Sampaio. – 2021.

99 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Sistema imune inato. 3. DDX41. 4. Expressão gênica. 5. STING. I.
Título.

CDD 661

LETICIA RODRIGUES SAMPAIO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *DDX41* E *STING* EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Roberta Taiane Germano de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que durante todo esse tempo me proporcionou bem estar físico e mental para a realização de todas as minhas atividades.

Aos meus queridos pais, Levie e Mirian, por todo amor e empenho dedicados a mim e minha educação. Vocês transmitiram valores extremamente valiosos. Eu amo vocês!

À minha irmã Milena, por todo companheirismo nos estudos até o ensino médio e por todo apoio durante a minha graduação. À minha irmã Maria Luiza, por todo carinho. Vocês são essenciais na minha vida.

Ao Luiz, que acompanhou de perto toda minha jornada de estudos e soube lidar com meus momentos de estresse e dúvida com muito carinho e compreensão, sem nunca duvidar do que eu sou capaz de conquistar. Obrigada pela paciência e pelas palavras de incentivo. Que a cada dia eu possa retribuir toda sua ajuda, carinho e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro, por ter me introduzido ao mundo da pesquisa, por me receber em seu laboratório e oferecer suporte acadêmico durante esse período. O Sr. é um exemplo de pesquisador.

À Roberta Taiane, que sempre esteve disponível para me auxiliar e para elucidar minhas dúvidas. Roberta, você é um exemplo de mulher, te admiro demais!

Ao Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves, por aceitar participar da minha banca e por todas as contribuições para minha formação como professor do curso de Biotecnologia, meu muito obrigada.

Aos meus colegas de turma da UFC, em especial Breno, Camila, Gabi, Lívia, Madu, Matheus e Saulo. Com vocês compartilhei as incertezas quanto ao futuro e recebi carinho e amparo. Vocês tornaram minha rotina mais leve, obrigada.

À Mayara, Sharlene e Dani pela coordenação do laboratório e por se disponibilizarem a me ajudar sempre que preciso. Eu tenho um carinho e admiração enorme por vocês.

Aos demais que fazem parte do Laboratório de Citogenômica do Câncer, Victor, Vanessa, Matheus, Ramon, Vitin, Ligiane, Thayres, Gustavo, Arthur, Leandro, Howard, Manu, Izabelle, Marília e Cristiane pelo clima amigável e de colaboração que vocês proporcionam dentro do laboratório. Agradeço também à Gabi, ao Gabriel e ao Wesley, pessoas que me receberam ao chegar no laboratório e que sempre estavam disponíveis para ensinar.

Aos professores do curso de Biotecnologia, por terem contribuído com todo os meus conhecimentos.

Ao NPDM, por ter me dado toda uma estrutura desejável durante a minha formação iniciante como pesquisadora.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica que tive durante toda a graduação.

A todos os meus familiares e amigos, por todo apoio e incentivo.

“Fazer o que você gosta é liberdade. Gostar do que você faz é felicidade.”

Frank Tyger

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma doença onco-hematológica que atinge a medula óssea e possui caráter heterogêneo. As principais manifestações da doença são a presença de citopenias, displasias de uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficaz e risco de progressão para leucemia mieloide aguda. O envelhecimento é um dos principais fatores de risco para a doença e por causa disso a incidência da SMD é maior em pessoas idosas. A patogênese da SMD envolve alterações citogenéticas e mutações gênicas em mais de 80% dos casos e genes envolvidos no reparo do DNA, metilação do DNA e *splicing* de RNA frequentemente estão desregulados na SMD. Além disso, observa-se a superexpressão de genes relacionados ao sistema imune em cerca de 50% dos pacientes, o que resulta em um perfil de estimulação imunológica crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações na expressão gênica de dois genes que possuem papel no sistema imune inato: *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD. Foram coletadas amostras de medula óssea de 73 indivíduos diagnosticados com SMD em hospital terciário e 4 controles saudáveis. O estudo citogenético foi realizado por banda-G e para analisar os níveis de expressão foi utilizado a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Os níveis de expressão dos genes foram associados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas e laboratoriais de impacto prognóstico. Verificamos que *DDX41* apresentava maior nível de expressão em pacientes com contagem de blastos na medula óssea superior a 10% em relação aos pacientes que tinham $\leq 2\%$ blastos e entre 5% - 10% de blastos ($p=0,002$ e $p=0,037$, respectivamente); maior expressão em pacientes com blastos $> 5\%$ em relação a pacientes com blastos $\leq 5\%$ ($p=0,017$); maior expressão em pacientes com o subtipo SMD-EB2, um subtipo que apresenta maior porcentagem de blastos na medula e possui perfil mais agressivo, em relação a pacientes do subtipo SMD-DM, um subtipo intermediário ($p=0,004$) e maior expressão em pacientes com formas avançadas da doença quando comparado com pacientes com formas iniciais da doença ($p=0,028$). *STING* apresentou um comportamento similar e observamos maior expressão deste gene em pacientes com contagem de blastos na medula óssea entre 5% - 10% quando comparados aos pacientes que tinham $\leq 2\%$ blastos ($p=0,016$); maior expressão em pacientes que possuíam 3 citopenias em comparação àqueles que possuíam 1 citopenia ($p=0,006$); maior expressão em pacientes com o subtipo SMD-EB1, em relação a pacientes do subtipo SMD-SA, um subtipo geralmente menos agressivo ($p=0,013$); maior expressão em pacientes com formas mais avançadas da SMD, incluindo ($p=0,006$) ou não o subtipo SMD-DM (0,015) e maior expressão em pacientes agrupados na categoria de risco alto + muito alto em relação a

pacientes agrupados na categoria de risco muito baixo + baixo ($p=0,006$). Nossos achados demonstram que *DDX41* e *STING* podem estar envolvidos na patogênese e evolução da SMD.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica. Sistema Imune Inato. *DDX41*. *STING*. Expressão Gênica.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is an onco-hematological disease that affects the bone marrow and has a heterogeneous character. The main manifestations of the disease are the presence of cytopenias, dysplasia of one or more cell lines, ineffective hematopoiesis and risk of progression to acute myeloid leukemia. Aging is one of the main risk factors for the disease and because of that the incidence of MDS is higher in elderly people. The pathogenesis of MDS involves cytogenetic alterations and gene mutations in more than 80% of cases, and genes involved in DNA repair, DNA methylation and RNA splicing are often unregulated in MDS. Furthermore, overexpression of genes related to the immune system is observed in about 50% of patients, which results in a profile of chronic immune stimulation. The aim of this study was to evaluate changes in gene expression of two genes that play a role in the innate immune system: *DDX41* and *STING* in patients with MDS. Bone marrow samples were collected from 73 individuals diagnosed with MDS at a tertiary hospital and 4 healthy controls. The cytogenetic study was performed by band-G and to analyze the expression levels the real-time PCR methodology (RT-qPCR) was used. Gene expression levels were associated with cytogenetic alterations, clinical and laboratory variables of prognostic impact. We found that *DDX41* had a higher expression level in patients with bone marrow blast counts greater than 10% compared to patients who had \leq 2% blasts and between 5% - 10% blasts ($p=0.002$ and $p=0.037$, respectively) ; greater expression in patients with blasts $>$ 5% compared to patients with blasts \leq 5% ($p=0.017$); greater expression in patients with the SMD-EB2 subtype, a subtype that has a higher percentage of blasts in the medulla and has a more aggressive profile, compared to patients of the SMD-DM subtype, an intermediate subtype ($p=0.004$) and greater expression in patients with advanced forms of the disease when compared to patients with early forms of the disease ($p=0.028$). *STING* showed a similar behavior and we observed greater expression of this gene in patients with blast counts in bone marrow between 5% - 10% when compared to patients who had \leq 2% blasts ($p=0.016$); greater expression in patients who had 3 cytopenias compared to those who had 1 cytopenia ($p=0.006$); greater expression in patients with the SMD-EB1 subtype, compared to patients with the SMD-SA subtype, a generally less aggressive subtype ($p=0.013$); greater expression in patients with more advanced forms of MDS, including ($p=0.006$) or not the MDS-DM subtype (0.015) and greater expression in patients grouped in the high + very high risk category compared to patients grouped in the risk category very low + low ($p=0.006$). Our

findings demonstrate that *DDX41* and *STING* may be involved in the pathogenesis and evolution of MDS.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome. Innate Immune System. *DDX41*. *STING*. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução dos sistemas de classificação da Síndrome Mielodisplásica	18
Figura 2 – Esquema de ativação da via <i>DDX41/STING</i>	29
Figura 3 – Níveis de expressão do <i>STING</i> em relação a variável Citopenias	48
Figura 4 – Níveis de expressão do <i>DDX41</i> em relação a variável Porcentagem de blastos categorizado segundo IPSS-R e porcentagem de bastos categorizada em 5%	49
Figura 5 – Níveis de expressão do <i>STING</i> em relação a variável Porcentagem de blastos categorizado segundo IPSS-R	50
Figura 6 – Nível de expressão do gene <i>DDX41</i> e <i>STING</i> em pacientes com SMD frente a categorização em subtipos da OMS 2016	52
Figura 7 – Nível de expressão do gene <i>DDX41</i> em pacientes com SMD frente a categorização em formas iniciais e avançadas	53
Figura 8 – Nível de expressão do gene <i>DDX41</i> em pacientes com SMD frente a categorização em formas iniciais e avançadas sem SMD-DM	54
Figura 9 – Nível de expressão do gene <i>STING</i> em pacientes com SMD frente a categorização do IPSS-R	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação clínica da SMD seguindo os critérios estabelecidos da OMS em 2016	18
Tabela 2 – Variáveis e valores de pontuações para prognóstico de IPSS-R	20
Tabela 3 – Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas	21
Tabela 4 – Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	21
Tabela 5 – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR	34
Tabela 6 – Caracterização descritiva das variáveis sociais e clínicas dos pacientes com SMD	39
Tabela 7 – Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico	40
Tabela 8 – Descrição clínica dos pacientes com SMD que participaram do estudo	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOM	Azoximetano
ATP	Adenia-tri-fosfato
BTK	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
CDN	Dinucleotídeos cílicos
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CTH	Células tronco hematopoiéticas
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DDT	<i>DNA-damage tolerance</i>
DDX41	<i>DEAD-Box Helicase 41</i>
DMBA	7,12 – dimetilbenzantraceno
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i>
DSS	Sulfato de dextrano de sódio
FAB	Franco-American-Britânica
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
IPSS	<i>Indice prognostic score system</i>
IRF3	Fator regulador de interferon 3
LMA	Leucemia mieloide aguda
LRR	Regiões ricas em leucinas
MDA5	Gene 5 associado à diferenciação de melanoma
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RIG-I	Gene I induzido por ácido retinóico
RLR	<i>RIG-like receptors</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMD	Síndrome mielodisplásica
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>

TBK1 *TANK-binding quinase 1*
TCGA *The Cancer Genome Atlas*
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR *Toll-like receptors*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica	14
1.2	Etiologia	14
1.3	Epidemiologia	15
1.4	Citogenética e alterações moleculares na SMD	16
1.5	Classificação Clínica da SMD	17
1.6	Estratificação Prognóstica da SMD	20
1.7	Patogênese	21
1.8	Sistema imunológico e SMD	23
1.9	<i>DDX41</i>	24
1.9.1	<i>DDX41 e o sistema imunológico</i>	25
1.9.2	<i>DDX41 e Síndrome Mielodisplásica</i>	26
1.10	<i>STING</i>	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Aspectos Éticos	31
3.2	Obtenção das amostras de medula óssea	31
3.3	Cariótipo por banda-G	32
3.4	Análise de Expressão Gênica por RT-Qpcr	33
3.4.1	<i>Extração do RNA total</i>	33
3.4.2	<i>Síntese de</i> <i>cDNA</i>	33
3.4.3	<i>RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>	34
3.5	Variáveis Analisadas	35
3.6	Análises Estatísticas	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Caracterização dos Pacientes	38
4.2	Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR	47
4.2.1	<i>Expressão gênica de DDX41 e STING em pacientes com SMD e controles</i> ...	47

4.2.2	<i>Expressão gênica de DDX41 e STING em relação ao sexo</i>	47
4.2.3	<i>Expressão gênica de DDX41 e STING em relação à idade</i>	47
4.2.4	<i>Expressão gênica de DDX41 e STING em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD</i>	47
4.2.4.1	<i>Achados de sangue periférico</i>	47
4.2.4.2	<i>Achados Medulares</i>	48
4.2.4.3	<i>Achados Citogenéticos</i>	51
4.3	Expressão gênica de DDX41 e STING na classificação e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD.....	51
4.3.1	<i>Classificação OMS 2016</i>	51
4.3.2	<i>Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R</i>	55
4.4	Expressão gênica de DDX41 e STING em pacientes com dependência transfusional	56
4.5	Expressão gênica de DDX41 e STING em relação a evolução para LMA ..	56
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE A – RESULTADOS ESTATISTICAMENTE NÃO SIGNIFICANTES	69
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma doença onco-hematológica que compreende um conjunto heterogêneo de disfunções clonais nas células-tronco hematopoiéticas (CTH). Como consequência da doença, há uma ineficiência hematopoiética que ocasiona citopenia(s) no sangue periférico e surgimento de displasias em uma ou mais linhagens celulares (BEHAM-SCHMID; SCHMITT-GRAEFF, 2020). A SMD já foi previamente designada como uma pré-leucemia devido às diferentes formas de apresentação citológica da medula óssea e devido à possibilidade de evolução para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) em 30%-40% dos pacientes (KOEFFLER; LEONG, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) realizou uma revisão de caracterização dos tumores de tecidos hematopoiéticos e linfoides em 2016 e adicionou novos achados associados a características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas, citogenéticas e moleculares na classificação diagnóstica de SMD (ARBER *et al.*, 2019). Além disso, outra característica marcante da doença é sua predominância em idosos (TOBIASSON; KITTANG, 2019; WEINBERG; HASSERJIAN, 2019).

1.2 Etiologia

Etiologicamente a SMD é classificada como primária (ou *de novo*), quando não há causa aparente ou secundária (também chamada de SMD relacionada à terapia), que ocorre após realização de quimioterapia e/ou radioterapia em tratamento a outra neoplasia. Cerca de 85% a 90% dos casos de SMD são classificadas como primária e de 10% a 15% enquadram-se em SMD secundária. O prognóstico da SMD secundária geralmente é pior em comparação aos casos *de novo*, pois a evolução clínica da doença é mais agressiva, a resposta ao tratamento é menor e a incidência de transformação em LMA é maior (MAGALHÃES *et al.*, 2018; RAZA; ALI; IVERSON, 2014).

Várias causas parecem estar relacionadas aos fatores de risco para o desenvolvimento da SMD primária: exposições ambientais ao benzeno e outros solventes, agrotóxicos, tabagismo e histórico familiar de neoplasias hematológicas (GADJI; POZZO, 2019). A idade avançada e, consequentemente, o envelhecimento do sistema hematopoiético

apresentam-se como fatores principais para o aumento da incidência da SMD (CHUNG; PARK, 2017).

1.3 Epidemiologia

A SMD é considerada uma doença senil, pois acomete principalmente indivíduos idosos, com a maioria dos pacientes possuindo mais de 65 anos ao diagnóstico (LEE *et al.*, 2016). A SMD raramente se manifesta na infância e é responsável por menos de 5% das neoplasias hematológicas pediátricas (HOFMANN, 2018). Em relação ao sexo, a taxa de incidência da SMD é, frequentemente, maior em homens do que em mulheres, 4,5 vs 2,7 por 100.000 habitantes por ano (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; PFEILSTÖCKER; TUECHLER; SANZ, 2016).

Nos Estados Unidos, o programa *SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results)* coleta informações sobre a incidência de câncer e dados de sobrevida. De acordo com este programa, entre 2007 e 2011 a taxa de incidência anual de SMD foi de 4,9 por 100.000 habitantes (COGLE, 2015). A taxa de incidência anual em outros países, como Alemanha, Canadá, Grécia, Japão e Suíça, varia entre 3,2 a 7 novos casos por 100.000 habitantes (NEUKIRCHEN, 2011; SLACK, 2018). A incidência da SMD aumenta consideravelmente com a idade, podendo chegar a 50 casos por 100.000 após os 70 anos (GADJI; POZZO, 2019).

O primeiro levantamento de casos de SMD no Brasil foi publicado em 2010. O estudo pioneiro avaliou 476 amostras de pacientes com SMD em tratamento, provenientes de 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados no período de janeiro de 2003 até dezembro de 2007. Constatou-se que a mediana das idades dos pacientes se encontrava em torno de 68,3 anos, e destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHAES *et al.*, 2010).

Um estudo multicêntrico sul-americano mais recente avaliou 1.080 pacientes diagnosticados com SMD *de novo*, provenientes do Brasil (345), Chile (100) e Argentina (635). Neste estudo, observou-se que os pacientes chilenos apresentam uma média de idade de 64 anos ao diagnóstico, com maior incidência em mulheres e com maior porcentagem de pacientes classificados como alto risco. Já os pacientes brasileiros e argentinos apresentaram características clínicas e epidemiológicas mais semelhantes, apresentando maior sobrevida quando comparado aos pacientes chilenos. De forma mais específica, os pacientes brasileiros apresentavam uma média de idade de 68 anos, com predomínio do sexo masculino e do

subgrupo SMD-DM (OMS 2016), além de serem de baixo risco (IPSS-R) (BELLi *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas da SMD são bastante heterogêneas e se assemelham com outras doenças. Tal fato acaba gerando a necessidade de um diagnóstico diferencial bastante complexo que é realizado usualmente por exclusão de outras causas de citopenia, presença de displasias morfológicas em linhagens celulares, aumento do número de blastos na medula óssea e anormalidades no cariótipo (VALENT, 2012). Por causa desses fatores, acredita-se que por muitos anos existiu uma subnotificação da SMD (COGLE *et al.*, 2011). O estudo do perfil genético desses pacientes contribuiu com uma maior conscientização diagnóstica e, como consequência do envelhecimento da população mundial, a incidência de SMD deve aumentar nos próximos anos (MA, 2012).

1.4 Citogenética e alterações moleculares na SMD

A citogenética desempenha um dos papéis cruciais na determinação do prognóstico da SMD (BERNASCONI *et al.*, 2013). Pacientes com SMD primária chegam a apresentar anormalidades citogenéticas em aproximadamente 50% dos casos, enquanto que para pacientes com SMD secundária essa taxa pode chegar a 80% dos casos. As alterações mais comuns em SMD encontradas usando o exame de cariótipo convencional (banda-G) são: -7/7q-, 5q-, +8, -Y, -X, i(17q), t(17p), -13/13q-, del(11q), del/t(12p), del(9q), t(11;16), t(3;21), t(1;3), t(2;11), inv/t(3) e t(6 ;9) (PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019). Para casos onde o cariótipo apresenta menos de 10 metáfases outras técnicas, como a citogenética molecular pela hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) podem ser utilizadas, porém, seu custo é bem mais alto do que um exame de citogenética convencional. Já para casos que possuem um número significativo de metáfase (≥ 20 metáfases), um estudo prospectivo de 50 casos de SMD realizado por Pinheiro e colaboradores (2009) verificou um benefício adicional da FISH em relação ao cariótipo convencional por banda-G de apenas 10%, o que torna o uso de citogenética convencional mais frequente (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Com o surgimento de metodologias de sequenciamento mais robustas, como a do sequenciamento de nova geração (NGS), novos estudos descrevendo uma análise cada vez mais abrangente sobre as mutações presentes na SMD foram realizados. Com isso, várias mutações genéticas foram identificadas entre os pacientes com SMD. Essas mutações podem, em parte, contribuir para a heterogeneidade clínica do avanço da doença e ter influência no prognóstico. Um exemplo da influência do perfil molecular foi a incorporação da mutação no

gene *Splicing factor 3b subunit 1 (SF3B1)* no algoritmo de diagnóstico do subtipo Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (SMD-SA) (MALCOVATI *et al.*, 2020).

Vários estudos examinando um grande número de amostras de pacientes de SMD identificaram mais de 40 genes mutantes recorrentes e com mais de 80% dos pacientes apresentando pelo menos uma mutação, incluindo aqueles com citogenética normal (BEJAR *et al.*, 2011; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013; HAFLERLACH *et al.*, 2014). Os genes que apresentam maior frequência de mutação são: *TET2*, *SF3B1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* entre outros.

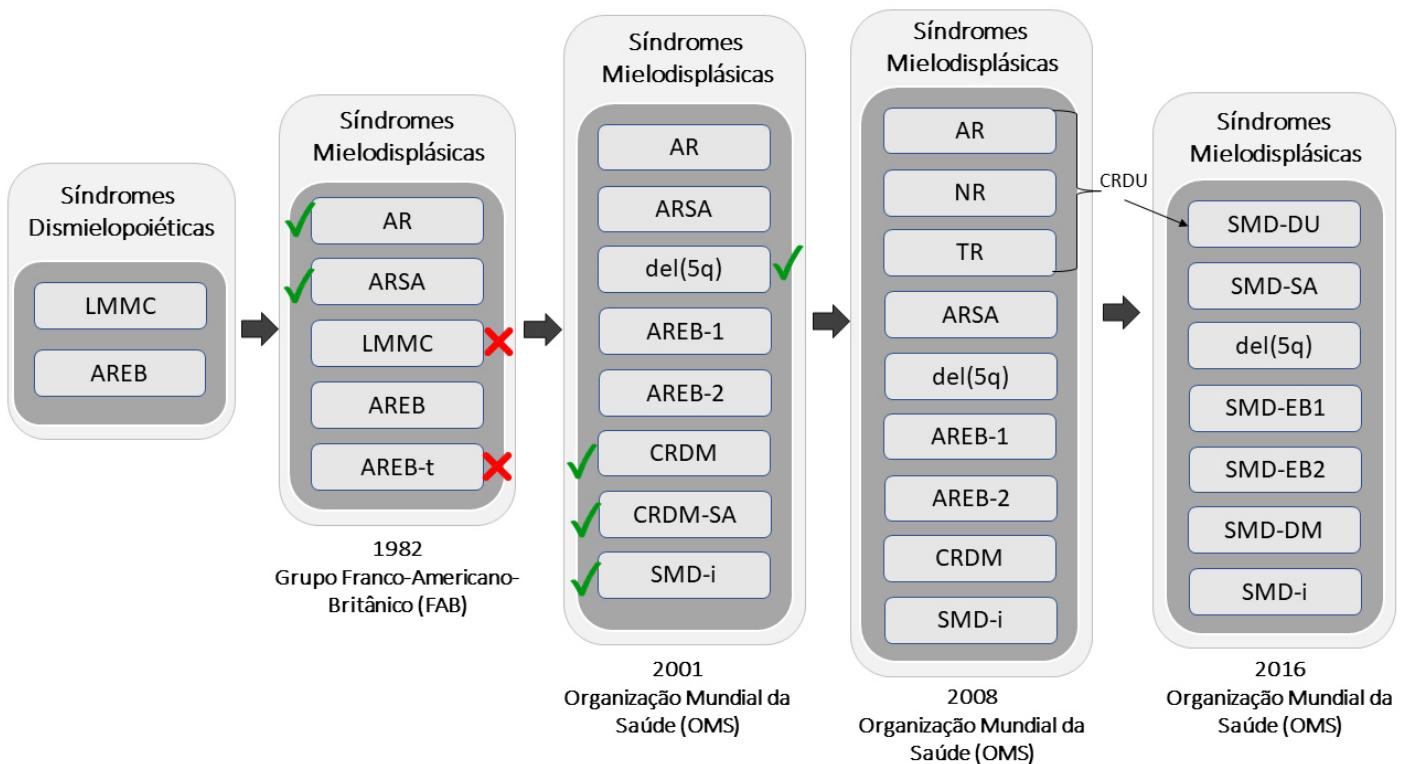
Algumas dessas mutações genéticas associam-se com características clínicas adversas, como cariótipos complexos (*TP53*), excesso de blastos na medula óssea (*RUNX1*, *NRAS* e *TP53*) e trombocitopenia grave (*RUNX1*, *NRAS* e *TP53*) (GREENBERG *et al.*, 2017). Estudos mais aprofundados nos genes que possuem alguma relação com a SMD permitem que novas abordagens em relação ao diagnóstico, prognóstico e tratamento sejam realizadas. Recentemente, foi identificado que mutações bialélicas no gene *TP53* apresentam desfecho ruim independente do Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-R), o que não foi observado para mutações monoalélicas no mesmo gene (BERNARD *et al.*, 2020).

1.5 Classificação Clínica da SMD

Por ser uma doença heterogênea e com manifestações comuns a outras doenças, a classificação da SMD passou por diversas interpretações até chegar na classificação utilizada atualmente. Na década de 70, não se sabia o quanto diferente a SMD era da Leucemia Aguda, sendo atribuído primeiramente o nome de Síndromes Dismielopoiéticas a doença. Já em 1982, o grupo Franco-American Britânico (FAB) criou um sistema de classificação para SMD baseado em aspectos morfológicos do sangue periférico e da medula óssea, que predominou até os anos 2000 (BENNETT, 1982).

Em 2001, com o objetivo de melhorar a classificação estabelecida pela FAB, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu uma nova classificação que passou a considerar aspectos clínicos, morfológicos, citoquímicos, imunofenotipagem e citogenéticos. Essa classificação da OMS sofreu uma revisão em 2008 e uma última revisão em 2016, quando foram acrescentadas análises dos aspectos moleculares da doença (SWERDLOW, 2008; SWERDLOW *et al.*, 2016) (Figura 1) (Tabela 1).

Figura 1 – Evolução dos sistemas de classificação da Síndrome Mielodisplásica



Abreviações: LMMC, leucemia mielomonocítica crônica; AREB, anemia refratária com excesso de blasto; AR, anemia refratária; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB-t, anemia refratária com excesso de blastos em transformação; Del(5q), SMD com del(5q); CRDM, citopenia refratária com displasia multilinhagem; CRDM-SA, citopenia refratária com displasia multilinhagem e sideroblastos em anel; SMD-i, SMD inclassificável; NR, neutropenia refratária; TR, trombocitopenia refratária; CRDU, citopenia refratária com displasia em única linhagem; SMD-DU, SMD com displasia em única linhagem; SMD-SA, SMD com sideroblastos em anel. Fonte: Adaptado de Zeidan *et al.* (2019).

Tabela 1 – Classificação clínica da SMD seguindo os critérios estabelecidos da OMS em 2016

(SMD-DU)	$\leq 1\%$ de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; $5\%*$ de Sideroblastos em anel; $\leq 5\%$ de blastos
(SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; $\leq 5\%$ de blastos
SMD COM SIDEROBLASTOS EM ANEL (SMD-SA)		
(SMD-SA-DU)	$\leq 1\%$ de Blastos; Uni ou	Displasia em 1 linhagem; $\geq 15\%$

	Bicitopenia	ou $\geq 5\%^*$ de Sideroblastos em anel; $\leq 5\%$ de blastos
(SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; $\geq 15\%$ ou $\geq 5\%^*$ de Sideroblastos em anel; $\leq 5\%$ de blastos

SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)

(SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
(SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos

SMD inclassificável (SMD-i)

SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%^!$ de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; $\leq 5\%$ de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	Displasia em 1 linhagem; $\leq 5\%$ de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; $\leq 1\%$ de blastos	de blastos Ausência de displasias; $\leq 15\%$ de Sideroblastos em anel; $\leq 5\%$ de blastos
SMD com del(5q) isolada	$\leq 1\%$ de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; $\leq 5\%$ de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)/-7

*Condição na presença da mutação do gene SF3B1; $\times 1\%$ de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas. **Legenda:** SMD-DU (SMD com displasia unilinhagem), SMD-DM (SMD com displasia multilinhagem), SMDSA-DU (SMD com sideroblastos em anel e displasia unilinhagem), SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel e displasia multilinhagem), SMD-EB (SMD com excesso de blastos). Fonte: Adaptado de Arber *et al* (2016)

1.6 Estratificação Prognóstica da SMD

O Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD foi desenvolvido em 1997 por Greenberg e colaboradores e revisado em 2012 (IPSS-R). Tal incide é uma estratificação prognóstica que tem o objetivo de prever a mediana de sobrevida esperada para cada paciente e o risco de transformação leucêmica. Este sistema de pontuação considera a porcentagem de blastos da medula óssea, o número de citopenias periféricas e o cariótipo dividido em três categorias (GREENBERG, 1997). O valor de IPSS é obtido pela soma de escores das três variáveis. Após a revisão em 2012, a porcentagem de blastos foi melhor estratificada, o número de citopenias foi substituído pelo grau de citopenias, foram incorporadas mais duas categorias citogenéticas e foi considerada a idade do paciente ao diagnóstico. A quantificação de ferritina sérica, lactato desidrogenase, B2-microglobulina e a performance entraram como importantes características para a sobrevida, mas não para a transformação leucêmica (GREENBERG *et al.*, 2012; JONAS; GREENBERG, 2015). Ao final, foram criadas 5 categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto risco (GREENBERG *et al.*, 2012) (Tabela 2-4).

Tabela 2 – Variáveis e valores de pontuações para prognóstico de IPSS-R

IPSS-R: Valores do escore prognóstico							
Variáveis Prognósticas	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Citogenética	Muito favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito desfavorável
Blastos na medula óssea (%)	≤ 2		> 2 a < 5		5 a 10		> 10
Hb (g/dL)	≥ 10		8 a < 10	< 8			
Neutrófilos (mm³)	≥ 800		< 800				
Plaquetas (mm³)	≥ 100	50 a < 100	< 50				

Fonte: Adaptado de GREENBERG *et al.*, 2012

Tabela 3 – Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas

IPSS-R: Grupo de Risco Citogenético	
Subgrupos de risco	Anormalidades citogenéticas
Muito favorável	-Y, del(11q)
Favorável	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duas alterações incluindo del(5q)
Intermediário	del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer outra alteração
Desfavorável	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duas alterações incluindo - 7/del(7q), complexo: 3 anormalidades
Muito desfavorável	Muito complexo: >3 anormalidades

Fonte: Adaptado de GREENBERG *et al*, 2012

Tabela 4 – Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R

IPSS-R: Categorias de risco prognóstico			
Categoria de risco	Escore de risco	Sobrevida	Evolução para LMA
Muito baixo	≤ 1,5	8,8 (7,8-9,9)	-
Baixo	> 1,5 - 3	5,3 (5,1-5,7)	10,8
Intermediário	> 3 - 4,5	3,0 (2,7-3,3)	3,2
Alto	> 4,5 - 6	1,6 (1,5-1,7)	1,4
Muito alto	> 6	0,8 (0,7-0,8)	0,73

Fonte: Adaptado de GREENBERG *et al.*, 2012

1.7 Patogênese

A patogênese da SMD ainda não foi totalmente elucidada, mas sabe-se que mutações em genes que regulam principalmente o *splicing* de RNA, metilação de DNA e acessibilidade à cromatina, fatores de transcrição, transdução de sinal e a resposta a danos ao DNA tem um papel importante no desenvolvimento da doença. Além disso, a geração de um microambiente medular tumorigênico e pró-inflamatório permite a manutenção de alterações

cromossômicas estruturais e mutações somáticas em células neoplásicas mieloides (PLATZBECKER, 2021).

O modelo de múltiplos passos é mais amplamente aceito para explicar como ocorre o surgimento da doença. De acordo com esse modelo, alterações funcionais nas células-tronco hematopoiéticas acontecem devido um clone anômalo e geneticamente instável se desenvolver no ambiente medular após sofrer mutações genéticas, citogenéticas e epigenéticas. Como consequências dessas alterações, há desregulação da imunidade inata, hematopoese ineficaz, alterações no processo de apoptose, erro nos mecanismos de reparo do DNA e de maquinaria do ciclo celular, o que pode progredir e originar a SMD (GARCIA-MANERO *et al.*, 2016; ADES *et al.*, 2014, CHAMSEDDINE *et al.*, 2016)

Além da exposição às substâncias de caráter genotóxicos, a idade avançada e o encurtamento dos telômeros também se mostram como fatores que provocam o surgimento da doença. No microambiente medular, as células-tronco hematopoiéticas podem permanecer quiescentes ou se diferenciar em células progenitoras hematopoiéticas multipotentes, dando origem à hematopoiése e, finalmente, às células do sangue periférico. É muito importante que a estabilidade genômica seja mantida durante esse processo de diferenciação e, para isso, uma rede de tolerância ao dano no DNA (DDT) é acionada. A DDT garante a integridade genômica no microambiente medular por conferir resistência contra fontes internas (metabolismo celular e erros na replicação do DNA) e externas (agentes genotóxicos e estresse oxidativo) de danos. Evidências mostram que o envelhecimento, característica marcante dos pacientes com SMD, leva à diminuição da DDT, ocasionando prejuízo funcional das células-tronco hematopoiéticas e acúmulo de mutações somáticas que geram o clone anômalo e instável (WESTERMANN; BULLINGER, 2021).

A vantagem seletiva do clone é fornecida por lesões genéticas somáticas denominadas mutações condutoras (Consórcio Internacional de Genoma do Câncer, 2020). A mutação inicial ocorre em uma célula-tronco hematopoiética capaz de auto-renovação. Essa célula pode surgir de uma CTH auto-renovável ou de um progenitor mielóide mais diferenciado que adquire a capacidade de se auto-renovar. Uma expansão clonal adicional pode ocorrer por meio do aumento da proliferação ou resistência à apoptose e por conta do microambiente medular anormal e pró-inflamatório. (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011a; SALLMAN; LIST, 2019; WINTER *et al.*, 2020).

Como resultado do papel desempenhado pelo perfil genético na patogênese da SMD, observa-se a presença de pelo menos uma mutação somática em mais de 80% dos pacientes diagnosticados e metade desses pacientes também podem apresentar alterações

cromossômicas (HOSONO, 2019; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013). Apesar da maioria das alterações somáticas serem passageiras e não terem consequências diretas para a hematopoese, as mutações condutoras podem conferir diferenciação anormal e permitem a expansão clonal. Por conta disso, a aquisição de mais de uma mutação em um clone expandido pode levar ao fenótipo característico da SMD ou até evolução para LMA (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016).

O acometimento por outras doenças de caráter clonal, como CHIP (Hematopoese clonal de potencial indeterminado) e CCUS (Citopenia clonal de potencial indeterminado), podem acarretar em neoplasias hematológicas e possuem características sobrepostas com a patogênese da SMD (CAZOLLA, 2020). Ademais, apesar de não ser tão frequente, a ocorrência de mutações em genes da linhagem germinativa também predispõe ao desenvolvimento de SMD (BEJAR; GREENBERG, 2017).

1.8 Sistema imune inato e SMD

A inflamação crônica devido à infecção persistente ou inflamação estéril é um fator predisponente bem estabelecido para o câncer (ELINAV *et al.*, 2013). A coexistência de outras doenças inflamatórias estão presentes em 10%-30% dos pacientes com SMD e existe uma chance de 1,5 a 3,5 vezes maior de pacientes que possuem doenças autoimunes desenvolverem a doença (GAÑÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2018). Esses achados sugerem que a ativação anormal de sinais imunes inatos e a inflamação associada contribuem para a patogênese dessa doença.

Nessa perspectiva os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) possuem um papel crucial para a ativação do sistema imune inato. Os PRRs são proteínas capazes de reconhecer moléculas frequentemente associadas a patógenos (também conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos - PAMPs) e moléculas associadas ao dano celular (chamadas de Padrões Moleculares Associados ao Dano – DAMPs). Existem quatro subfamílias principais de PRRs - os receptores Toll-like (TLRs), os receptores NOD-like (NLR), os receptores semelhantes ao gene indutível por ácido retinóico 1 (RIG-1 – RLRs) e os receptores de lectina do tipo C (CLRs). Além desses, existem diversos sensores citosólicos que também funcionam como PRRs (TAKEUCHI, 2012; AMARANTE-MENDES *et al.*, 2018). O estudo de como esses receptores atuam durante o câncer ampliam o entendimento da patogênese do tumor e abrem possibilidades de imunoterapias (SHEKARIAN *et al.*, 2017).

Estudos mostram que os receptores TLRs estão implicados no desenvolvimento da SMD. O TLR mais estudo em SMD é o TLR4 e sua ativação sustentada está associada com

o dano ao DNA mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo que a sinalização crônica de TLR4 pode resultar diretamente no acúmulo de genotoxicidade e contribuir para a transformação maligna (WALTER *et al.*, 2015). A expressão de TLR2 também está implicada na SMD e a ativação deste receptor leva à proliferação de células-tronco hematopoiéticas em camundongos, aumento da apoptose e diferenciação eritróide prejudicada em células humanas da medula óssea (ZENG *et al.*, 2016; HERMAN *et al.*, 2016). Por fim, recentemente um estudo do nosso grupo observou aumento da expressão do receptor TLR3 e de alguns retrovírus endógenos em pacientes de SMD que apresentavam diseritropoiese (OLIVEIRA, 2021).

Receptores do tipo NLRs também apresentam relação com a SMD. O inflamassoma, complexo proteico responsável pela ativação de processos inflamatórios e morte celular, depende do receptor NLRP3 e as células progenitoras de SMD superexpressam as proteínas do inflamassoma e manifestam complexos NLRP3 ativados que direcionam a morte celular piroptótica (BASIORKA *et al.*, 2016). A ativação desses PRRs leva à desregulação de citocinas inflamatórias, como as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), e fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e regulador de interferon 3 (IRF3) (DE MATOS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Por fim, o próprio envelhecimento representa um estado de inflamação estéril crônica de baixo grau e esse estado de inflamação latente pode ajudar na proliferação e sobrevivência de clones malignos de SMD (WINTER *et al.*, 2020).

1.9 *DDX41*

O gene *DDX41* codifica uma enzima helicase de RNA. As helicases de RNA são enzimas altamente conservadas que utilizam ATP para reorganizar RNAs ou interações entre RNA-proteína (complexos ribonucleoproteicos). As helicases podem ser classificadas em seis superfamílias (SF1-6) e aquelas compostas por RNA podem pertencer à superfamília 1 (SF1) ou superfamília 2 (SF2) (JANKOWSKY, 2011). Dentro da SF2, a subfamília com a maior quantidade de membros é a família de proteínas DEAD-box (DDX), assim chamada por causa da presença do bloco de motivo conservado dos seguintes aminoácidos: aspartato (D) – glutamato (E) – alanina (A) – aspartato (D), é nessa subfamília que está presente *DDX41* (JIANG *et al.*, 2017). O gene *DDX41* humano está localizado no cromossomo 5 na porção do braço longo na região 35.3 (5q35.3) sendo composto por 17 exons e 16 íntrons. Estudos mostram que esse gene está em múltiplos papéis celulares, contribuindo para várias vias e

processos, incluindo *splicing* de mRNA, processamento de rRNA e sensor de DNA intracelular em células dendríticas mieloides, contribuindo com a imunidade inata (JIANG *et al.*, 2020).

1.9.1 DDX41 e o sistema imunológico

O sistema imunológico inato do hospedeiro fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos. Através dos receptores de reconhecimento de padrões, as células de mamíferos detectam uma ampla variedade de estruturas moleculares altamente invariantes conhecidas como PAMPs ou DAMPs. Os PAMPs muitas vezes são exigidos por micróbios para sobrevivência ou patogenicidade e os DAMPs podem ser produzidos como resultado de dano celular causado por infecções ou por lesões, sendo frequentemente liberado por células em apoptose (ZINDEL, KUBES, 2020).

Algumas helicases de RNA já são conhecidas pelo papel que desempenham no sistema imune inato, como o gene I induzido por ácido retinoico (RIG-I) e o gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5). RIG-I e MDA5 são PRRs localizados no citoplasma celular que possuem capacidade de reconhecer PAMPs e acionar resposta imunológica. Tal fato incentivou que mais estudos fossem realizados em busca de descobrir novas helicases de RNA que também pudessem atuar como PRRs. Em 2011, Zhang e colaboradores realizaram um estudo que utilizou pequenos RNAs de interferência (siRNA) para triagem de membros da subfamília de helicases DEAD-box e, como resultado, o estudo identificou *DDX41* como um sensor de DNA intracelular em células dendríticas mieloides. Os pesquisadores também verificaram que *DDX41* interage com o estimulador dos genes de interferon (*STING*) para acionar resposta de interferon via ativação da proteína quinase ativada por mitógeno TBK1 (TANK-binding quinase 1) e dos fatores de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B) e IRF3 (fator regulador de interferon) (ZHANG *et al.*, 2011).

Consolidou-se, então, que na via de sinalização das respostas imunes inatas, a helicase *DDX41* se comporta como um receptor reconhecendo DNA de fita dupla (dsDNA) e dinucleotídeos cíclicos (CDN) (OMURA *et al.*, 2016). Existem dois domínios na proteína codificada por *DDX41*: DEADc e HELICc, o funcionamento de *DDX41* ocorre quando HELICc é fosforilado pela tirosina quinase de Bruton (BTK) e, em seguida, há o reconhecimento do dsDNA e/ou CDN por meio do seu domínio DEADc. Após o reconhecimento do ligante, o *DDX41* se liga ao *STING* localizado na membrana do retículo endoplasmático. O *STING* promove subsequentemente a fosforilação de TBK1 e IRF3, que

finalmente induzem a produção de interferon tipo I. (PARVATIYAR *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2015) (Figura 2).

1.9.2 *DDX41* e neoplasias hematológicas

A predisposição hereditária para o desenvolvimento de uma neoplasia hematológica é incomum, de forma que um estudo de predisposição genética familiar nem sempre faz parte do diagnóstico na prática ambulatorial. Entretanto, com o avanço nas tecnologias de sequenciamento, foi possível investigar e identificar genes com mutações na linhagem germinativa que ocasionavam a predisposição a neoplasias hematológicas (DUPLOYEZ *et al.*, 2016). O resultado de vários estudos nesse campo culminou na incorporação de uma seção chamada “neoplasias mieloides com predisposição de linhagem germinativa” na revisão de 2016 da OMS para classificação de neoplasias mieloides e leucemia aguda (ABER *et al.*, 2016).

Alguns genes, como *RUNX1*, *CEBPA* e *GATA2*, já possuíam implicações na predisposição a neoplasias mieloides e são, frequentemente, associados com um início de malignidade mais jovem. Em contraste, as neoplasias hematológicas com mutações na linhagem germinativa de *DDX41* apresentam tempo de latência maior e mediana de idade ao diagnóstico em torno de 60 anos (QUESADA *et al.*, 2019). Com mais de 70 famílias descritas até o momento, a mutação em *DDX41* na linhagem germinativa é uma das mutações de predisposição à malignidade mieloide mais frequente (CHEAH *et al.*, 2017). Além disso, características que também podem ser observadas nos pacientes com mutações germinativas em *DDX41* é o surgimento de mutação somática concomitante (no mesmo ou em outros genes), presença de cariótipo normal e uma prevalência em pacientes de alto risco com pior prognóstico (POLPRASERT *et al.*, 2015; VAIRO *et al.*, 2019).

Recentemente, uma revisão sistemática sobre os estudos que apresentavam mutação em *DDX41* foi realizada. Com resultado desta revisão, percebeu-se que a incidência de mutações em *DDX41* nos pacientes rastreados com neoplasias hematológicas foi de 3,3% e era maior em homens ($n = 10.975$). Além disso, dentre as neoplasias hematológicas, 41,5% eram SMD e 32,9% eram LMA e quase metade dos pacientes tinham pelo menos uma mutação somática concomitante (WAN; HAN, 2021). Algumas neoplasias hematológicas possuem o transplante de medula óssea como opção de tratamento e a busca por um doador compatível começa muitas vezes entre os familiares (DÖHNER *et al.*, 2015; GANGAT *et al.*,

2016). Dessa forma, um estudo de predisposição hereditária pode mudar completamente a terapêutica do tratamento.

Em relação a SMD de forma mais específica, o fato de pacientes com mutações germinativas em *DDX41* apresentarem idade mais avançada pode dificultar o diagnóstico de uma predisposição familiar, haja vista que a SMD esporádica também acomete mais pessoas idosas. Ademais, as vias de reparo de danos ao DNA são importantes para a remoção de diferentes tipos de danos ao DNA em células-tronco hematopoiéticas e, na SMD, muitas vezes os genes de reparo encontram-se desregulados (ZHOU *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2017). Como consequência de um reparo defeituoso, fragmentos de DNA podem chegar ao citoplasma celular e acionar *DDX41*. O papel completo que *DDX41* pode realizar na SMD ainda não foi totalmente descrito e mais estudos poderão auxiliar em uma melhor compreensão.

1.10 *STING*

O gene *STING*, também conhecido como *TMEM173/ERIS/MITA*, localiza-se na região 31.2 do braço longo do cromossomo 5 (5q31.2) e codifica uma proteína de 379 aminoácidos que atua como um receptor de reconhecimento de padrão no sistema imune inato. O *STING* foi identificado em 2008 durante uma triagem buscando moléculas que levassem à expressão de INFs do tipo I (IFN-β) no sistema de sinalização imune inata (ISHIKAWA; BARBER, 2008). Estudos posteriores demonstraram que a molécula sinalizadora *STING* está associada ao retículo endoplasmático e induz a produção de INFs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias (ISHIKAWA *et al.*, 2009).

A atuação do *STING* no sistema imune inato pode acontecer de duas formas: sendo um adaptador *downstream* de sensores de DNA citosólico, como *DDX41*, ou ligando-se diretamente a dinucleotídeos cíclicos liberados por bactérias. Uma vez ativado, o *STING* transloca-se do retículo endoplasmático através do complexo de Golgi para uma região perinuclear distinta, onde fosforila a quinase de ligação TBK1. Quando fosforilada, a quinase TBK1 fosforila IRF3, o que resulta no tráfego de IRF3 para o núcleo e, posteriormente, na ativação de INFs do tipo I e citocinas (TANAKA; CHEN, 2012; RAN *et al.*, 2014). Além disso, a quinase TBK1 também pode interagir com quinases IκB e ativar o fator de transcrição NF-κB (ABE; BARBER, 2014) (Figura 2).

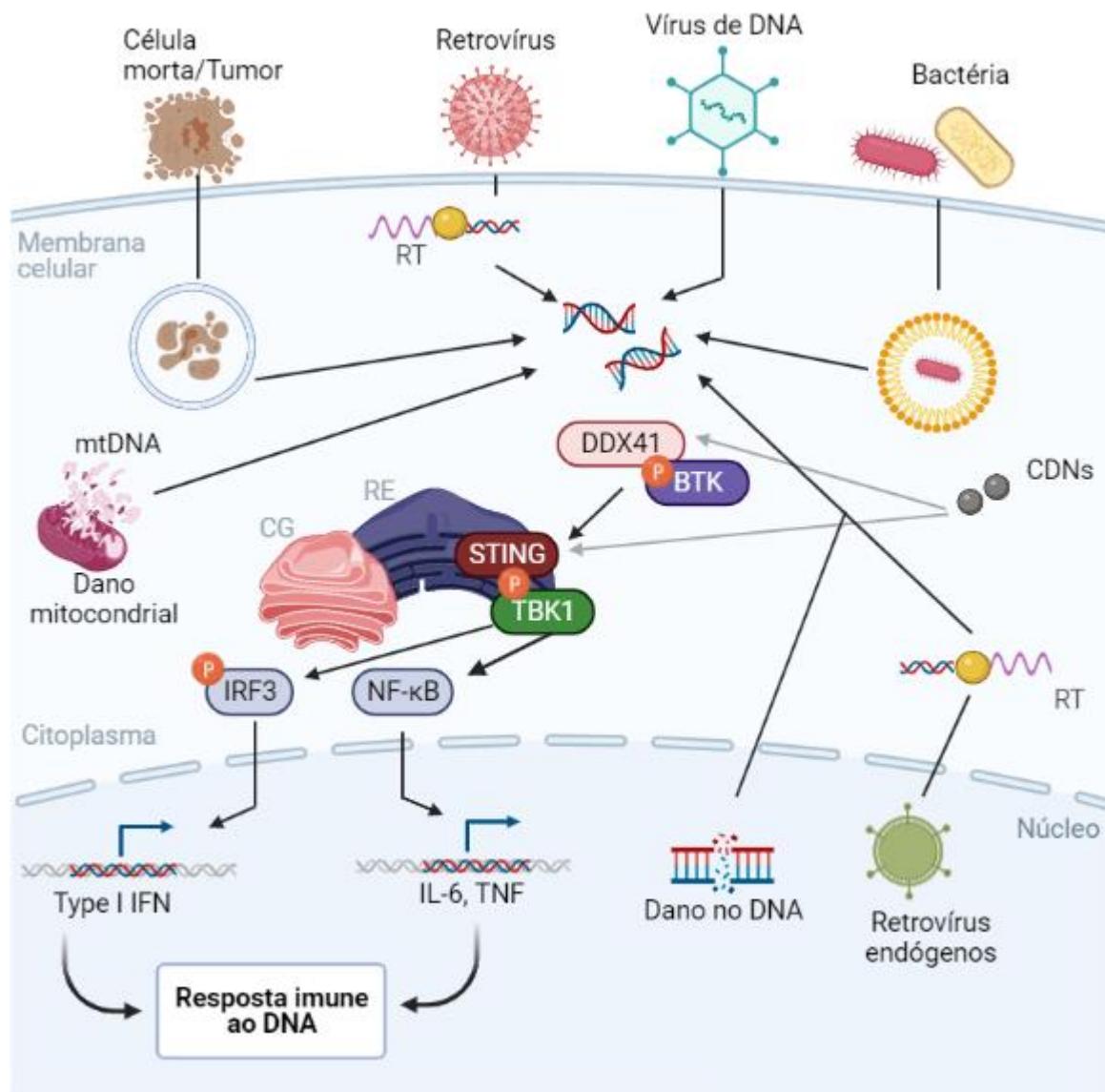
O comportamento de *STING* como uma proteína adaptadora na geração de respostas imunes inatas e sua atuação possui semelhanças com MAVS e TRIF, outras

proteínas adaptadoras que funcionam à jusante dos receptores de reconhecimento de padrão RLRs e TLRs, respectivamente. Essas três proteínas adaptadoras possuem um motivo proteico conservado que precisa ser fosforilado para que ocorra recrutamento de IRF3 e produção de interferon do tipo I (LIU *et al.*, 2015).

Além do papel contra patógenos, *STING* possui associações com doenças inflamatórias e doenças autoimunes. Sliter e colaboradores verificaram que a via *STING* era acionada contra estresses mitocondriais em modelos *in vivo* para doença de Parkinson (SLITER *et al.*, 2018). Observou-se também que a hiperatividade do *STING* é responsável pela inflamação aguda no infarto do miocárdio e pancreatite (KING *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2018). No contexto das doenças autoimunes, o defeito em enzimas responsáveis por degradar o DNA (DNAses) leva ao reconhecimento inadequado de DNA no citoplasma, ocasionando respostas inflamatórias via *STING* (AHN *et al.*, 2012).

O papel da via *STING* no câncer é ambíguo. Ahn e colaboradores realizaram diversos estudos *in vivo* com camundongos *knock-out* para *STING* para compreender melhor o papel dessa molécula no câncer. Quando intoxicados com o agente cancerígeno 7,12 – dimetilbenzantraceno (DMBA), os camundongos deficientes em *STING* foram resistentes à tumorigênese cutânea, demonstrando que, quando presente, *STING* estimula um estado tumoral (AHN *et al.*, 2014). Em contraste a esse papel oncogênico, quando os camundongos com deficiência em *STING* foram intoxicados com o indutor de dano ao DNA azoximetano (AOM) e com o agente inflamatório sulfato de dextrano de sódio (DSS) houve propensão à carcinogênese associada à colite, nesse caso a deficiência de *STING* foi prejudicial, indicando que essa molécula constitui um componente crítico da resposta inicial do hospedeiro ao dano intestinal e é essencial para ativar as vias de reparo tecidual que podem ajudar a prevenir a tumorigênese (AHN *et al.*, 2015).

Figura 2 – Esquema de ativação da via *DDX41/STING*



A presença de dsDNA no citoplasma da célula pode acionar a via *DDX41/STING*. *DDX41* atua como sensor de dsDNA e dinucleotídeos cíclicos e ativa *STING*. A ativação ocorre com auxílio das quinas *BTK* e *TBK1*. Diversos processos, endógenos ou exógenos, podem levar ao surgimento de dsDNA no citoplasma: infecção por patógenos, danos mitocondriais que ocasionam liberação de mtDNA, danos no DNA nuclear e expressão de retrovírus endógenos, por exemplo. Legenda: CDNs: dinucleotídeos cíclicos; CG: Complexo de Golgi; RE: Retículo Endoplasmático; RT: transcriptase reversa. Fonte: Adaptado de BARBER, 2011; LEE *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os níveis de expressão do mRNA dos genes *DDX41* e *STING* em pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis de expressão dos genes *DDX41* e *STING* em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de SMD;
2. Associar os níveis de expressão gênica às características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMD;
3. Associar os níveis de expressão gênica dos genes *DDX41* e *STING* às alterações citogenéticas;
4. Associar os níveis de expressão gênica à evolução para LMA.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC (número de processo: 47730721.9.0000.5054) por meio do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado na sessão apêndice. A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução n.º 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

3.2 Obtenção das amostras de células de medula óssea

Um total de 8 ml de medula óssea foi coletado de 73 pacientes portadores de SMD e 4 indivíduos saudáveis em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA. São separados 5 ml para os procedimentos de extração de RNA total a fim de realizar os experimentos de expressão gênica e 3 ml para os procedimentos de Citogenética Clássica. Os 73 pacientes diagnosticados com SMD de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde revisado de 2016 (VARDIMAN *et al.*, 2019) tiveram 2 de seus genes analisados em amostras de medula óssea. Os pacientes foram atendidos em um hospital terciário de referência da Universidade Federal do Ceará no período de 2008 a 2018. A medula óssea dos pacientes e dos indivíduos saudáveis foi coletada após eles assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após revisão de prontuários, os dados de expressão gênica foram correlacionados com os dados clínico-laboratoriais e os dados citogenéticos.

Para o processo de separação das células dos tubos que continham o material medular, realizou-se uma centrifugação a 1.811g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foi retirado o sobrenadante que continha o plasma e armazenado em microtubos para futuras pesquisas proteômicas. O material restante foi lavado com 1ml de solução de lise (25ml de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M) e transferido para um tubo do tipo Falcon de 50mL que continha 24ml de solução de lise. É necessário deixar o tubo com o material em gelo por 15 minutos para que então ele seja homogeneizado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Logo após, o sobrenadante é descartado e o *pellet* é

novamente lavado com 5ml de solução de lise. O material é deixado descansando novamente em gelo por 10 minutos e, após esse tempo, é realizada uma nova centrifugação. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 250 μ L de PBS. Posteriormente, adicionou-se 750 μ L de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) e o conteúdo foi homogeneizado com pipeta até a dissolução completa do *pellet*, sendo transferido para um *eppendorf* de 1,5mL. Ao final de todo o procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80 °C.

3.3 Cariótipo por banda-G

A técnica de citogenética foi realizada a partir dos protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO *et al.*, 2009). A amostra de medula é colhida em tubos estéreis contendo heparina e são divididas em dois frascos contendo 8mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 2 mL de soro fetal bovino e 100 μ L de streptomicina e penicilina. O material foi cultivado por 24 horas em estufa 37° C. Em seguida, adiciona-se 40 μ L de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. O material é então centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos. Antes de centrifugar novamente, é adicionado 0,5mL de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético) e homogeneizado. Após a centrifugação, o material foi lavado por 3 vezes em solução de Carnoy até completar o volume de 10mL, ressaltando que para cada lavagem foi necessário centrifugar a amostra. Por fim, retirou-se a solução de lavagem de cada tubo até um limite proporcional a quantidade de *pellet*, seguido de uma homogeneização até a dissolução do *pellet*. Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas utilizadas para microscopia óptica e secadas na placa aquecedora a 45° C. Estas lâminas são depois aquecidas por 10 minutos na placa aquecedora a 85° C. O bandeamento é realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright. Para cada paciente, são analisadas 20 metáfases e todas capturadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision®. Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram confirmados segundo os critérios estabelecidos pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (MCGOWAN-JORDAN, 2016).

3.4 Análise de Expressão Gênica por RT-qPCR

3.4.1 Extração do RNA total

A extração de RNA das células da medula dos pacientes com SMD e dos controles saudáveis foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Em cada 1mL de Trizol LS Reagente® deve-se encontrar 10^6 células armazenadas, sendo assim, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio para desproteinização e 10 μ L de glicogênio, em seguida, foram homogeneizados em vórtex e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi retirado de cada amostra e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400 μ L de isopropanol e incubados por 60 minutos a -20° C. Após esse tempo, realizou-se outra centrifugação com as mesmas especificações, porém pelo dobro do tempo (30 minutos), o sobrenadante foi depois descartado por inversão e, após o *pellet* ter secado, ele foi diluído em água livre de RNase.

Ao final, para a quantificação das amostras, realizaram-se leituras espectrofotométricas em equipamento Nanodrop nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, obtendo suas correlações e concentrações adquiridas. Amostras que apresentaram boa correlção (entre 1.8-2.2) foram selecionadas.

3.4.2 Síntese de cDNA

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000 ng/ μ L. Para cada reação, utilizou-se de 2,0 μ L de buffer, 0,8 μ L de dNTP, 2,0 μ L de Random Primers, 1,0 μ L de Multiscribe Reverse Transcriptase™. As quantidades que foram citadas tiveram que ser multiplicadas pelo número total de amostras com RNA total para a produção de um “Mix” de reação. Em seguida, 5,8 μ L desse Mix foram adicionados em microtubos de 0,2 mL apropriados para PCR com o volume calculado de RNA seguindo o protocolo (Quantificação de ácidos nucleicos em Nanodrop®). Os volumes de cada microtubo foram completados com água ultrapura até o volume final padrão de 20 μ L. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação com spin por cerca de 10 segundos. As amostras foram submetidas ao termociclador, onde foram realizados os seguintes ciclos: Desnaturação a 25 °C por 10 minutos; Anelamento a 37 °C por 120 minutos;

Extensão a 85° C por 5 minutos; e Finalização a 4 °C. Por fim, as amostras de cDNA foram completadas até o volume de 100 µL com água ultra pura e armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20 °C.

3.4.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

A quantificação da expressão gênica dos dois genes avaliados neste estudo foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizado no aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações foram preparadas utilizando o Kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda TaqMan assay® (Tabela 5).

Tabela 5 – Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR

Símbolo	Nomenclatura	Ensaio TaqMan
Genes estudados		
<i>DDX41</i>	DEAD-Box Helicase 41	Hs00169602_m1
<i>STING/TMEM173</i>	Estimulador de genes do interferon	Hs00736955_g1
Genes normalizadores		
UBC	Ubiquitina C	Hs00824723_m1
B2M	β2-Microglobulina	Hs00187842_m1
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desigrogenase	Hs03929097_g1

Fonte: Elaborado pela autora

O preparo e armazenamento dos materiais foram realizados segundo as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi otimizado em 10 µL. Para cada reação foram utilizados 5 µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,5 µL de sonda TaqMan assay®, 2,0 µL de água ultrapura e 2,5 µL de cDNA. As reações foram realizadas utilizando-se placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) recobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Após o preparo dos poços, as placas foram centrifugadas por 1 minuto a 4.500 rpm. As condições para a PCR foram: pré-aquecimento a 50 °C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95 °C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60 °C). Em todas as etapas, as amostras estavam imersas no gelo.

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata sendo consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-template controls*) adicionando-se em cada placa água purificada no lugar do cDNA.

Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados três genes de referência: *β2-microglobulina* (B2M), *Ubiquitina C* (UBC) e *Gliceraldeído fosfato desidrogenase* (GAPDH). Para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos (Cq - quantification cycle). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), foram considerados os mais estáveis.

Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *UBC* e o *B2M*. Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System* v1.3 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (Cq). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de Cq foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Para normalizar os valores de Cq, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq's dos genes de referência utilizados (*UBC* e *B2M*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK *et al.*, 2001). A nomenclatura utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi padronizada e seguida conforme o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

3.5 Variáveis Analisadas

- ✓ **Grupo:** Caso e Controle;

- ✓ **Sexo:** Feminino e Masculino;
- ✓ **Idade:** ≤ 60 anos e > 60 anos;
- ✓ **Idade IPSS-R:** ≤ 60 anos, > 60 - ≤ 70 anos, > 70 anos - ≤ 80 anos e > 80 anos (GREENBERG *et al.*, 2012);
- ✓ **Classificação do número de citopenias no sangue periférico:** 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- ✓ **Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R):** ≥ 10 g/dL, $8 < 10$ g/dL e < 8 g/dL;
- ✓ **Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R):** ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- ✓ **Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):** ≥ 100.000 por mm^3 , 50.000 - < 100.000 por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- ✓ **Celularidade:** Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- ✓ **Diseritropoiese:** Ausência e Presença;
- ✓ **Disgranulopoiese:** Ausência e Presença;
- ✓ **Dismegacariopoiese:** Ausência e Presença;
- ✓ **Faixas de porcentagem de sideroblastos em anel:** 0, 1-14% e $> 15\%$;
- ✓ **Faixas de porcentagem de blastos na medula (IPSS-R):** $\leq 2\%$, > 2 a $< 5\%$, $> 5\%$ - $\leq 10\%$ e $> 10\%$;
- ✓ **Faixa de porcentagem de blastos na medula categorizada em 5%:** $\leq 5\%$ e $> 5\%$
- ✓ **Cariótipo:** Normal e Alterado;
- ✓ **Cariótipo (Aneuploidia):** Alterado com aneuploidia e alterado sem aneuploidia;
- ✓ **Cariótipo (Alteração no cromossomo 7):** Alterado com del(7q) e alterado sem del(7q);
- ✓ **Cariótipo (Alteração no cromossomo 5):** Alterado com del(5q) e alterado sem del(5q);
- ✓ **Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R:** muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- ✓ **Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R categorizado:** muito baixo + baixo, intermediário, alto + muito alto;
- ✓ **Quanto a classificação da OMS (2016):** SMD-DU (SMD com Displasia de Única Linhagem), SMD-SA (SMD com Sideroblastos em Anel), SMD-DM (SMD com Displasia de Múltipla Linhagem), SMD-EB1 (SMD com Excesso de Blastos I) e SMD-EB2 (SMD com Excesso de Blastos I);

- ✓ **Dependência Transfusional:** Ausência e Presença [utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI *et al.*, 2005)];
- ✓ **Evolução para LMA:** Ausência e Presença.

3.6 Análises Estatísticas

Os resultados gerados pelas análises de expressão gênica foram avaliados pelos resultados de cada Cq (*quantitative cycle*) de cada amostra de cDNA (em duplicatas). Em seguida, para normalizar os valores de Cq com o objetivo de diminuir as diferenças geradas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq de uma amostra foi subtraído pela média geométrica dos Cq's dos genes constitutivos utilizados (*B2M* e *UBC*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, posteriormente, convertidos para $2^{-\Delta\text{Cq}}$ (LIVAK *et al.*, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Para as variáveis maiores ou iguais a 50 casos, foi realizado o teste de Skinner's/Kurtosis com objetivo de avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal. Com essa mesma finalidade, para as variáveis com menos de 50 casos, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Os valores de outliers foram retirados do estudo, porque apresentavam valores contrastantes com os demais. A partir da normalização dos casos, foram realizados testes paramétricos através de testes T de *Student*, quando se comparavam médias entre dois grupos, e o teste de *one-way* ANOVA, quando se comparavam três ou mais grupos.

O pós-teste (post-hoc) para o ANOVA foi definido pela análise de homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Se a homogeneidade fosse confirmada (*p*-valor $\geq 0,05$), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Se não houvesse homogeneidade (*p*-valor $< 0,05$), o pós-teste foi o teste de Games-Howell. As variáveis que não possuíam distribuição normal foram analisadas através dos seguintes testes não paramétricos: Mann-Whitney para a comparação da mediana entre dois grupos, e teste de Kruskal-Wallis para a comparação da mediana em variáveis com três ou mais grupos. Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta\text{Cq}}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (IC) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de *p* $< 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 21.0).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

Nesse estudo, o número amostral foi de 73 pacientes para o grupo SMD e 4 indivíduos saudáveis para o grupo controle, somando 77 indivíduos. Dos 73 pacientes incluídos neste estudo, 33 indivíduos (45,2%) eram do sexo feminino e 40 indivíduos (54,8%) do sexo masculino (Tabela 6).

Com relação à idade dos pacientes, a média foi de 66,6 anos e a mediana 69 anos (mínimo de 19 anos e máximo de 91 anos). A variável idade foi categorizada em dois grupos: idade categorizada (\leq 60 anos e $>$ 60 anos) e idade categorizada de acordo com o IPSSR (GREENBERG *et al.*, 2012) (\leq 60 anos, $>$ 60 - \leq 70 anos, $>$ 70 - \leq 80 anos e $>$ 80 anos). Na primeira categorização, os indivíduos se concentraram no grupo $>$ 60 anos (69,9%), em contraste aos demais que representavam 30,1%. Em relação à segunda categorização, a distribuição foi relativamente homogênea com 30,1% no grupo \leq 60 anos, 20,5% no grupo $>$ 60 - \leq 70 anos, 30,1% no grupo $>$ 70 anos - \leq 80 anos e 19,3% no grupo $>$ 80 anos (Tabela 6).

Em relação à variável celularidade, apenas 32 pacientes apresentavam biópsia medular. Destes, 3 pacientes apresentaram medula hipocelular (9,4%), 4 apresentavam medula normocelular (12,5%) e 25 apresentaram medula hipercelular (78,1%). Dos achados da medula óssea referentes ao mielograma, 59 pacientes apresentaram dados sobre o número de suas displasias. Observou-se predomínio de displasia da linhagem eritróide, em 47 (79,7%) pacientes, seguida por 35 (59,3%) pacientes com dismegacariopoiese e 28 (47,5%) pacientes apresentando disgranulopoiese. Quanto à porcentagem de blastos, obtivemos resultado de 57 dos 73 pacientes, destes, a maioria apresentou \leq 2% de blastos (66,7%) (Tabela 6).

Para a porcentagem de sideroblastos em anel, obtivemos o resultado de 57 pacientes. Não foi observada a presença em 36 (63,2%) pacientes, e dos 21 pacientes que apresentaram, houve um predomínio da faixa que corresponde a $>$ 15%, com 17 (81%) pacientes, seguida de 4 (19%) pacientes na faixa de 1 - 14% (Tabela 6).

Em relação aos achados sobre as variáveis clínicas relacionadas ao sangue periférico, 65 pacientes tinham dados informados. Destes, 21 pacientes apresentavam uma citopenia (32,3%), 26 pacientes apresentavam duas citopenias (40%) e 18 pacientes apresentavam três citopenias (27,7%). Para os valores de hemoglobina, a maioria dos pacientes apresentava hemoglobina <8 g/dL (41,6%), seguido por pacientes com hemoglobina >10 g/dL (29,2%) e por pacientes com hemoglobina entre 8 g/dL - 10 g/dL

(29,2%). De 65 pacientes, a maioria apresentava a contagem de neutrófilos (ANC) $\geq 800/\text{mm}^3$, confirmado em 48 pacientes (73,8%). E, por fim, em relação à contagem de plaquetas, dos 68 pacientes, 36 deles apresentavam valores acima de $100.000/\text{mm}^3$ (50,7%). Todos esses achados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Caracterização descritiva das variáveis sociais e clínicas dos pacientes com SMD

Variáveis		Nº	%
Grupo	Controle	4	5,2%
	Caso	73	94,8%
Sexo	Feminino	33	45,2%
	Masculino	40	54,8%
Idade (Categorizada de acordo com o IPSS 2012)	≤ 60 anos	22	30,1%
	$> 60 - \leq 70$ anos	15	20,5%
	$> 70 - \leq 80$ anos	22	30,1%
	> 80 anos	14	19,3%
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	3	9,4%
	Normocelular	4	12,5%
	Hipercelular	25	78,1%
Diseritropoese	Presença	47	79,7%
	Ausência	12	20,3%
Dismegacariopose	Presença	35	59,3%
	Ausência	24	40,7%
Disgranulopoese	Presença	28	47,5%
	Ausência	31	52,5%
Presença de Sideroblastos em anel	0%	36	63,2%
	$\geq 1\% - \leq 14\%$	4	7,0%
	$\geq 15\%$	17	29,8%
Faixas das percentagens de blastos	$\leq 2\%$	38	66,7%
	> 2 a $< 5\%$	6	10,5%
	$> 5\% - \leq 10\%$	7	12,3%
	$> 10\%$	6	10,5%
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10	19	29,2%

	8 - <10	19	29,2%
	<8	27	41,6%
Contagem absoluta de neutrófilos (ANC) (mm ³)	≥800	48	73,8%
	<800	17	26,2%
Plaquetas (mm ³)	≥100	33	50,8%
	50 - <100	16	24,6%
	<50	16	24,6%

Fonte: Elaborado pela autora

A citogenética por banda G foi realizada para todos os indivíduos do estudo, entretanto só obtivemos dados de 71 pacientes. Destes, 18 apresentavam ausência de metáfase (25,4%) e 53 (74,6%) apresentaram metáfases para análise. Dentre os 53 que apresentaram metáfases, 29 deles apresentavam cariótipo normal (54,7%) e 24 apresentavam cariótipo alterado (45,3%).

Quanto às alterações citogenéticas mais comuns encontradas na SMD, observou-se que 9 pacientes (17%) apresentavam deleção no cromossomo 5-del(5q) e 4 pacientes (7,5%) apresentavam deleção no cromossomo 7-del(7q). Além disso, 11 pacientes (20,8%) apresentavam cariótipo alterado com aneuploidia. Em relação ao prognóstico, segundo dados do IPSS-R, dos 53 que se aplicavam, 37 apresentavam prognóstico favorável (69,8%). Com relação ao grupo de risco, os pacientes também foram classificados conforme o IPSS-R, havendo o predomínio de pacientes de baixo risco (18/51, 35,3%) (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência dos resultados citogenéticos e seu impacto prognóstico em pacientes com SMD ao diagnóstico

Variáveis		Nº	%
Metáfase	Presença	53	74,6%
	Ausência	18	25,4%
Cariótipo	Normal	29	54,7%
	Alterado	24	45,3%
Cariótipo (Deleção do 5q)	Com deleção 5q	9	17%
	Sem deleção 5q	15	28,3%
Cariótipo (Deleção do 7q)	Com deleção 7q	4	7,5%
	Sem deleção 7q	20	37,7%

Cariótipo (Aneuploidia)	Com aneuploidia	11	20,8%
	Sem aneuploidia	13	24,5%
	Muito favorável	3	5,7%
	Favorável	37	69,8%
Prognostico (IPSS-R)	Intermediário	7	13,2%
	Desfavorável	5	9,4%
	Muito desfavorável	1	1,9%
Grupo de risco (IPSS-R)	Muito baixo	12	23,5%
	Baixo	18	35,3%
	Intermediário	10	19,6%
	Alto	6	11,8%
	Muito alto	5	9,8%

Fonte: Elaborado pela autora

Dos pacientes avaliados, 60 foram classificados de acordo com a OMS 2016 (Tabela 8), sendo 57 (95%) pacientes classificados como SMD primária e 3 (5%) como SMD secundária. Dentre os pacientes classificados como SMD primária, o subtipo mais frequente foi SMD com Displasia em Multilinhagens com 23 (31,5%) pacientes, seguido pelo subtipo SMD com Sideroblastos em Anel com 13 (17,8%) pacientes, 9 pacientes com subtipo SMD com Excesso de Blastos I (12,3%), 8 pacientes com subtipo SMD com Excesso de Blastos II (11%) e 7 (9,6%) pacientes do subtipo SMD com Displasia Unilinhagem.

Quanto ao acompanhamento terapêutico, observamos que 31 (58,5%) pacientes tornaram-se dependentes transfusionais, quando utilizado o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante o período de 4 meses estabelecidos por Malcovati *et al.* (2005) (Tabela 8). No que se refere à progressão da doença e evolução, constatamos que 3 (7%) dos pacientes evoluíram para LMA e, por fim, verificou-se que 30 (54,5%) pacientes foram a óbito no decorrer da execução do presente estudo (Tabela 8).

Tabela 8 – Descrição clínica dos pacientes com SMD que participaram do estudo

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	OMS	IPSS-R	DT	Ev.LMA	Óbito
1	F	28	-	46,XX[20]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Não
2	F	78	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DM	Risco muito baixo	Sim	Não	Não
3	F	45	Normocelular	46,XX[7]	SMD-DM	Risco muito baixo	Não	-	Não
4	F	77	-	46,XX[20]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	Sim
5	M	85	Hipercelular	46,XY[15]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Não
6	M	89	-	46,XY,t(5;19)(q13.2;q13.4)[3]/46,XY,t(5;9)(q13.2;q13.4), t(8;21)(q21.3;q22.12)[3]/46,Y,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4), t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD-EB2	Risco muito alto	-	-	Sim
7	M	31	-	46,XY[24]	SMD-DM	Baixo risco	Não	Não	Não
8	M	73	-	80~90<3n>XXYY,...[3]/46,XY,del(5)(q32),del(11)(q32),del(17)(p11.2)[7]/ 46,XX[11]	SMD-EB1	Alto risco	Não	-	Não
9	M	55	-	46,XY[15]	SMD-DM	Risco muito baixo	Não	Não	Não
10	M	52	-	46,XY[20]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	-
11	M	74	-	46,XY,del(11)(q23)[7]/46,XY[13]	SMD-DU	Risco muito baixo	-	-	-
12	M	56	Hipercelular	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/ 46,XY,-5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD-EB1	Risco muito alto	-	-	Não

13	F	71	-	Ausência de metáfases	-	-	-	-	-
14	F	65	Hipercelular	46,XX[20]	SMD-DM	Risco intermediário	Não	Não	Não
15	M	66	Hipercelular	46,XY[17]	-	Baixo risco	Não	Não	Sim
16	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA	Risco muito baixo	Não	Não	Sim
17	M	62	Hipercelular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD-EB2	Alto risco	Sim	-	Sim
18	M	85	Normocelular	46,XY[20]	SMD-EB1	Risco intermediário	Não	Não	Sim
19	F	65	-	46,XY[9]	-	Baixo risco	Não	Não	Não
20	F	84	-	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	SMD-DU	Baixo risco	-	Não	Não
21	F	72	Hipercelular	46,XX[6]	SMD-DU	Risco muito baixo	Não	Não	Não
22	F	51	Hipercelular	46,XX[11]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não
23	F	77	-	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim
24	M	79	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	Não	-
25	M	62	Hipercelular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA	Risco intermediário	Sim	Não	Não
26	M	19	Hipercelular	46,XY[22]	SMD-DU	Baixo risco	Sim	-	-
27	M	84	-	46,XY[20]	SMD-EB1	Alto risco	Sim	-	-
28	M	82	Hipercelular	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	Não	Sim
29	M	85	-	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	SMD-EB1	Risco intermediário	Não	-	Sim

30	M	79	-	46,XY,del(5)(q34),del(11)(q23)[7]/46,XY[5]	SMD-DM	Risco intermediário	Sim	Não	Sim
31	M	76	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	-	-	-
32	M	84	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Não	Não	Sim
33	M	74	Hipercelular	46,XY[3]	SMD-DM	Risco muito baixo	Não	Não	Sim
34	M	82	-	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	Não	Não	Sim
35	M	75	-	92,XXYY[4]/46,XY[8]	SMD-EB1	Alto risco	Sim	-	Sim
36	M	62	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	-	Não	Não
37	M	40	-	-	-	-	-	-	-
38	M	77	-	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/ 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/ 46,XY[2]	SMD-DM	Risco muito alto	Sim	Não	Sim
39	M	49	Hipercelular	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/ 47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[8]	SMD-DM	Risco muito alto	Sim	-	Sim
40	M	69	-	49,XY,+13,+14,+mar[9]/46,XY[14]	-	-	-	-	-
41	M	87	Normocelular	46,XY[6]	SMD-DU	Baixo risco	Não	Não	Não
42	M	59	-	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	Não	Não	Não
43	M	64	Hipercelular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	SMD-EB2	Risco muito alto	Sim	Não	Não
44	F	47	-		SMD-DU	Baixo risco	Sim	Não	Sim
45	F	73	-	Ausência de metáfases	-	-	-	-	-
46	F	59	-	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	Sim	Sim	Não

47	F	66	Hipercelular	46,XX[10]	SMD-SA	Risco intermediário	Sim	Não	Não
48	F	41	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	-	Sim
49	F	57	Hipercelular	46,XX[8]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	Sim
50	F	57	-	46,XX[21]	-	-	-	-	-
51	F	65	-	46,XX[15]	-	Risco intermediário	-	Não	Não
52	F	72	-	-	SMD-EB2	-	Sim	Não	Não
53	F	65	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	Sim	Não	Não
54	F	45	Hipocelular	Ausência de metáfases	-	-	-	-	Sim
55	F	75	-	Ausência de metáfases	-	-	-	-	-
56	F	57	Hipocelular	46,XX del(11)(q23)[11]/46,XX	-	Risco muito baixo	-	-	-
57	F	77	-	46,XX,del(7)(q32)[2]/46,XX[26]	SMD-DU	Alto risco	Sim	-	Sim
58	F	87	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-SA	-	Não	Não	Sim
59	F	87	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-SA	-	Não	Não	Sim
60	F	73	-	47,XX,+mar[4]/46,XX[14]	-	Risco intermediário	-	-	-
61	F	60	-	46,XX[10]	SMD-DM	Risco muito baixo	-	-	-
62	F	44	-	46,XX[20]	SMD-EB2	Alto risco	Sim	-	Sim
63	F	82	Hipercelular	46,XX[5]	SMD-SA	Baixo risco	Sim	-	Sim
64	F	76	-	46,XX[15]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não

65	M	69	-	46,XY[10]	-	Risco muito baixo	-	-	-	Sim
66	M	58	Hipocelular	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Sim	Sim	Sim
67	M	55	-	45,X,-Y[15]/45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/46,XY[2]	SMD-EB2	Risco intermediário	-	-	-	-
68	F	40	-	Ausência de metáfases	SMD-DM	-	-	-	-	Não
69	M	79	Hipercelular	46,XY[7]	SMD-DM	Baixo risco	Sim	Não	-	-
70	M	68	-	46,XY,add(12)(q24.33)[2]/46,XY,del(17)(q23)[3]/46,XY[10]	SMD-DM	Risco intermediário	Sim	Não	Sim	Sim
71	M	74	Hipercelular	46,XY[6]	SMD-SA	Baixo risco	Não	Não	Não	Não
72	M	73	-	Ausência de metáfases	SMD-EB2	-	Sim	-	Sim	
73	M	66	Hipercelular	Ausência de metáfases	SMD-EB1	-	Sim	Não	Sim	

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

A seguir serão apresentadas as associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *DDX41* e *TMEM173/STING* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com os indivíduos controles. Para melhor entendimento, os resultados serão apresentados separadamente por variável analisada.

4.2.1 Expressão gênica do *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD e controles saudáveis

As amostras de pacientes com SMD apresentaram maior expressão dos genes *DDX41* e *STING* do que amostras controles, porém, o resultado não foi estatisticamente significante ($p>0,05$) (Apêndice A).

4.2.2 Expressão gênica de *DDX41* e *STING* em relação ao sexo

Não encontramos associações significativas entre o nível de expressão dos genes *DDX41* e *STING* no grupo SMD versus sexo ($p>0,05$) (Apêndice A).

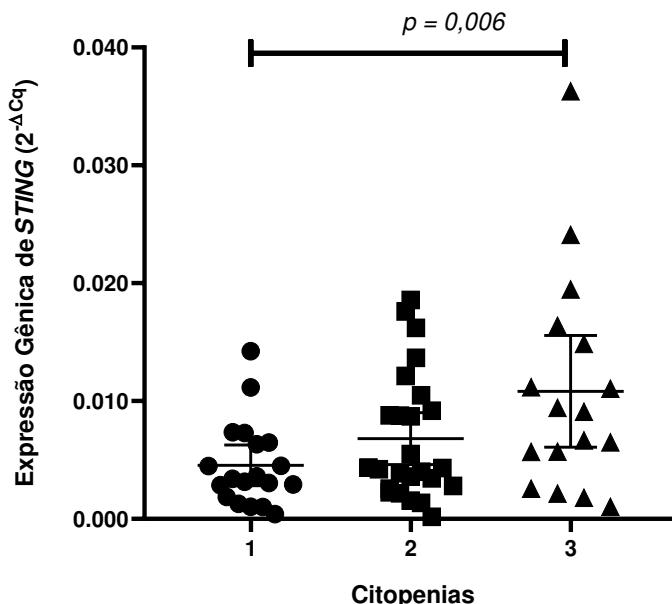
4.2.3 Expressão gênica de *DDX41* e *STING* em relação à idade

A variável idade foi categorizada de duas formas: a primeira em ≤ 60 anos > 60 anos e a segunda de acordo com o IPSS-R em ≤ 60 anos, 60-70 anos, 70-80 anos e > 80 anos. Ambas as categorias não apresentaram associações significativas nos genes avaliado ($p>0,05$) (Apêndice A).

4.2.4 Expressão gênica de *DDX41* e *STING* em relação às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD

4.2.4.1 Achados de sangue periférico

Para a variável número de citopenias, verificamos um aumento de expressão do gene *STING* nos pacientes que apresentavam 3 citopenias quando comparados com aqueles que apresentavam 1 citopenia ($p=0,006$) (Figura 3).

Figura 3 – Níveis de expressão do *STING* em relação a variável Citopenias

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Citopenias	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Krustal-Wallis [‡]	p-valor
1	19	,003270950	,0035880774	,002815423	,006274219	0,042	0,006
2	25	,004308000	,0053456082	,004601965	,009015083		
3	17	,007870000	,0092250819	,006076112	,015562311		

[‡]Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Não foram encontradas outras associações significativas entre o nível de expressão de *STING* e as demais variáveis relacionadas ao sangue periférico: Hemoglobina categorizada pelo IPSS-R, ANC categorizado pelo IPSS-R e Plaquetas (categorizada pelo IPSS-R ou não) ($p > 0,05$).

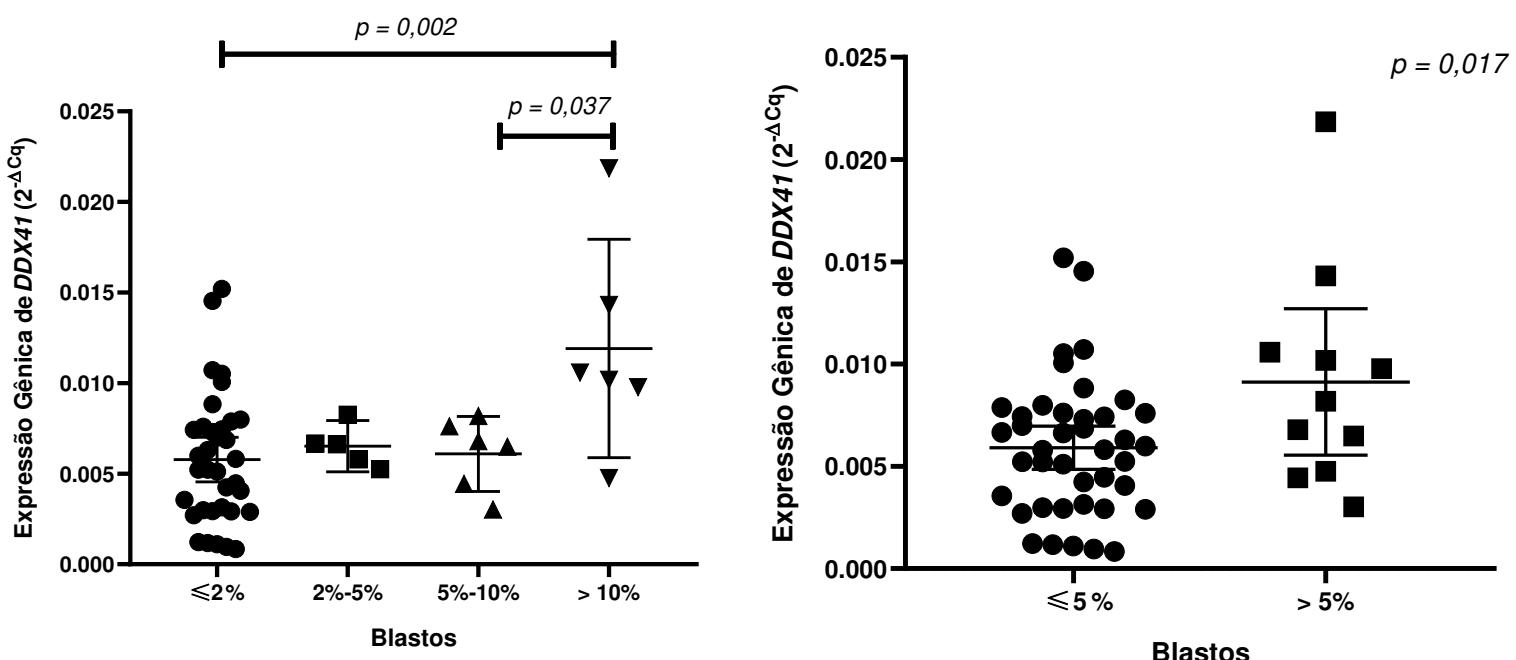
Não foram encontradas associações significantes entre o nível de expressão de *DDX41* e os achados relacionados ao sangue periférico ($p > 0,05$).

4.2.4.2 Achados Medulares

Em relação aos achados medulares, quando avaliado a porcentagem de blastos na medula óssea categorizado segundo IPSS-R, os pacientes com valores $> 10\%$ de blastos na medula óssea apresentaram maior nível de expressão de *DDX41* do que pacientes com valores

de blastos entre 5%-10% e pacientes com valores de blastos $\leq 2\%$ ($p=0,037$ e $p=0,002$, respectivamente) (Figura 4). Além disso, quando categorizado em porcentagem de blastos menor do 5% ou maior do que 5%, pacientes com contagem de blastos maiores do que 5% apresentaram maior expressão de *DDX41* ($p=0,017$) (Figura 4). Para o gene *STING*, quando analisada a variável porcentagem de blastos categorizado pelo IPSS-R, pacientes com valores entre 5%-10% de blastos apresentaram maiores valores de expressão de *STING* do que pacientes com $\leq 2\%$ de blastos ($p=0,016$) (Figura 5).

Figura 4 – Níveis de expressão do *DDX41* em relação a variável Porcentagem de blastos categorizado segundo IPSS-R e porcentagem de bastos categorizada em 5%



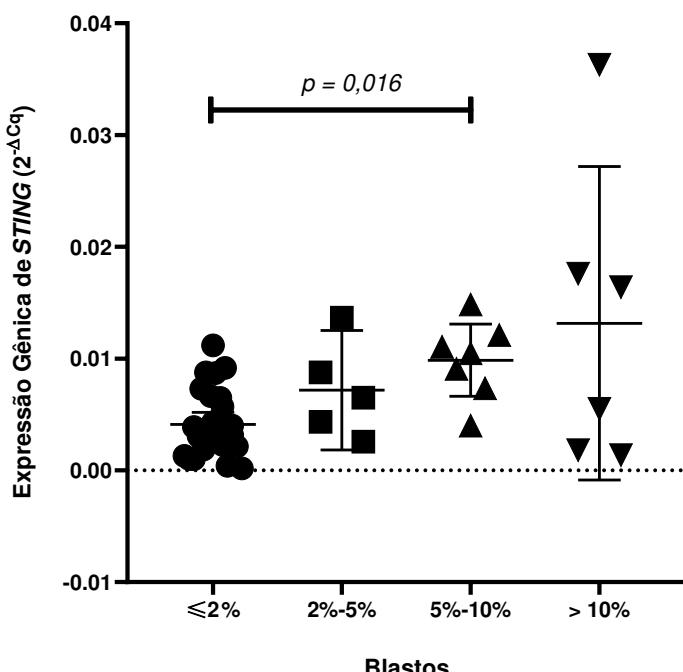
Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Blastos	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova†	Teste de Levene	Tukey
$\leq 2\%$	35	,005776160	,0035829936	,004545359	,007006961	0,004	0,060	0,002
$> 2\% - \leq 5\%$	5	,006514980	,0011381185	,005101819	,007928141			-
$> 5\% - \leq 10\%$	6	,006089450	,0019757242	,004016055	,008162845			0,037
$> 10\%$	6	,011908917	,0057473714	,005877420	,017940413			0,002/0,037

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Blastos categorizado em 5%	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
≤ 5%	41	,005911080	,0033430068	,004855897	,006966264	0,134	0,017
> 5%	11	,009125127	,0053308877	,005543788	,012706466		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 5 – Níveis de expressão do *STING* em relação a variável Porcentagem de blastos categorizado segundo IPSS-R



Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Blastos	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova†	Teste de Levene	Games-Howell
≤ 2%	35	,005776160	,0035829936	,004545359	,007006961	0,002	0,000	0,016
> 2% - ≤ 5%	5	,006514980	,0011381185	,005101819	,007928141			-
> 5% - ≤ 10%	6	,006089450	,0019757242	,004016055	,008162845			0,016
> 10%	6	,011908917	,0057473714	,005877420	,017940413			-

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Não encontramos associações significativas entre os níveis de expressão dos genes estudados e as demais variáveis relacionadas aos achados medulares: Celularidade, Displasias, Diseritropoiese, Disgranulopoiese, Dismegacariopoiese e Sideroblastos em anel; ($p>0,05$) (Apêndice A).

4.2.4.3 Achados Citogenéticos

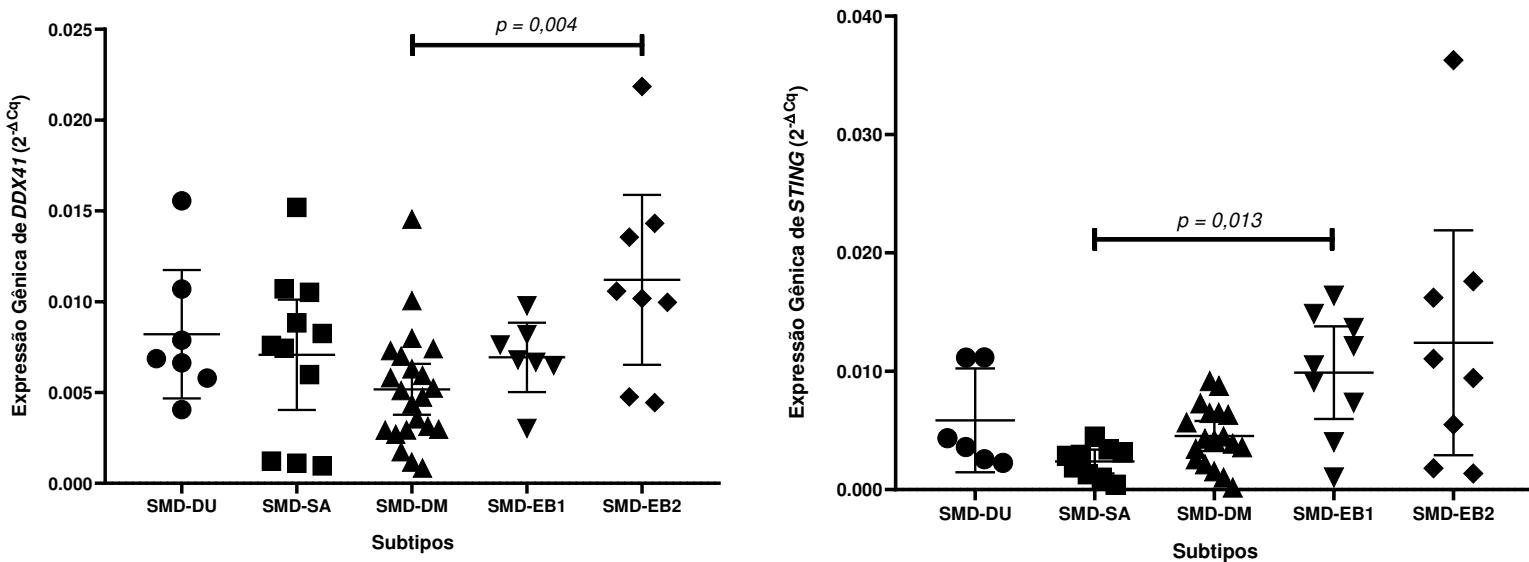
Os níveis de expressão dos genes *DDX41* e *STING* não apresentaram significância ($p>0,05$) para as variáveis desses achados: Cariótipo (normal ou alterado), Aneuploidia, Alterações envolvendo o cromossomo 5 del(5q) e Alterações envolvendo o cromossomo 7 del(7q) (Apêndice A).

4.3 Expressão gênica do *DDX41* e *STING* na classificação clínica e estratificação prognóstica dos pacientes com SMD

4.3.1 Classificação OMS 2016

Em relação à classificação dos pacientes de acordo com os subtipos estabelecidos pela OMS (SWERDLOW *et al.*, 2016), verificamos maior expressão dos genes *DDX41* e *STING* em subtipos mais agressivos da doença. Constatamos que pacientes classificados como SMD-EB2 (SMD com excesso de blasto II) apresentaram maior expressão do gene *DDX41* em relação aos pacientes diagnosticados como SMD-DM (SMD com displasia Multilinhagem) ($p=0,004$) (Figura 6). Além disso, verificamos também uma maior expressão de *STING* nos pacientes classificados com SMD-EB1 (SMD com excesso de blasto I) frente aos pacientes classificados com SMD-SA (SMD com Sideroblastos em anel) ($p=0,013$) (Figura 6).

Figura 6 – Nível de expressão do gene *DDX41* e *STING* em pacientes com SMD frente a categorização em subtipos da OMS 2016



Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Subtipos OMS	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova [‡]	Teste de Levene	Tukey
SMD-DU	7	,008208871	,0038227017	,004673462	,011744281	0,009	0,216	-
SMD-SA	11	,007072909	,0045199474	,004036367	,010109451			-
SMD-DM	22	,005173705	,0031619742	,003771764	,006575645			0,004
SMD-EB1	7	,006933014	,0020697617	,005018804	,008847225			-
SMD-EB2	8	,011205463	,0055927120	,006529838	,015881087			0,004

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Subtipos OMS	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova [‡]	Teste de Levene	Games-Howell
SMD-DU	6	,005852783	,0041821390	,001463898	,010241669	0,002	0,000	-
SMD-SA	9	,002372889	,0013124230	,001364071	,003381707			0,013

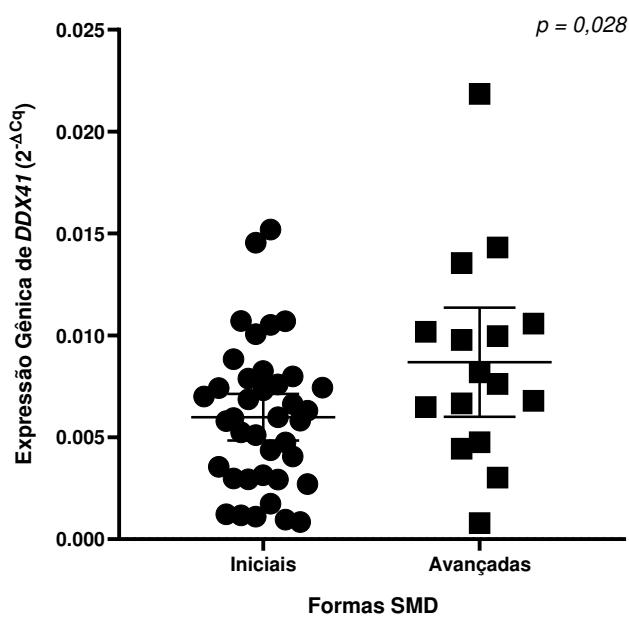
SMD-DM	18	,004532939	,0025635249	,003258128	,005807750			-
SMD-EB1	9	,009884556	,0050849354	,005975928	,013793183			0,013
SMD-EB2	8	,012405263	,0113687641	,002900738	,021909787			-

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N°: número de casos.

Em relação à forma da doença, duas categorizações foram feitas: a primeira considerava SMD-DU, SMD-SA e SMD-DM como formas iniciais da doença e SMD-EB1 e SMD-EB2 como formas avançadas da doença; a segunda categorização desconsiderou SMD-DM (subtipo intermediário), ficando SMD-DU e SMD-SA nas formas iniciais e SMD-EB1 e SMD-EB2 permaneceram nas formas avançadas.

Quando considerada a primeira categorização, pacientes com formas avançadas de SMD apresentaram maiores níveis de expressão de *DDX41* do que os pacientes com formas iniciais da doença ($p=0,028$) (Figura 7). *STING* apresentou maiores níveis de expressão em formas avançadas da doença em ambas as categorizações ($p=0,015$ na primeira e $p=0,006$ na segunda) (Figura 8).

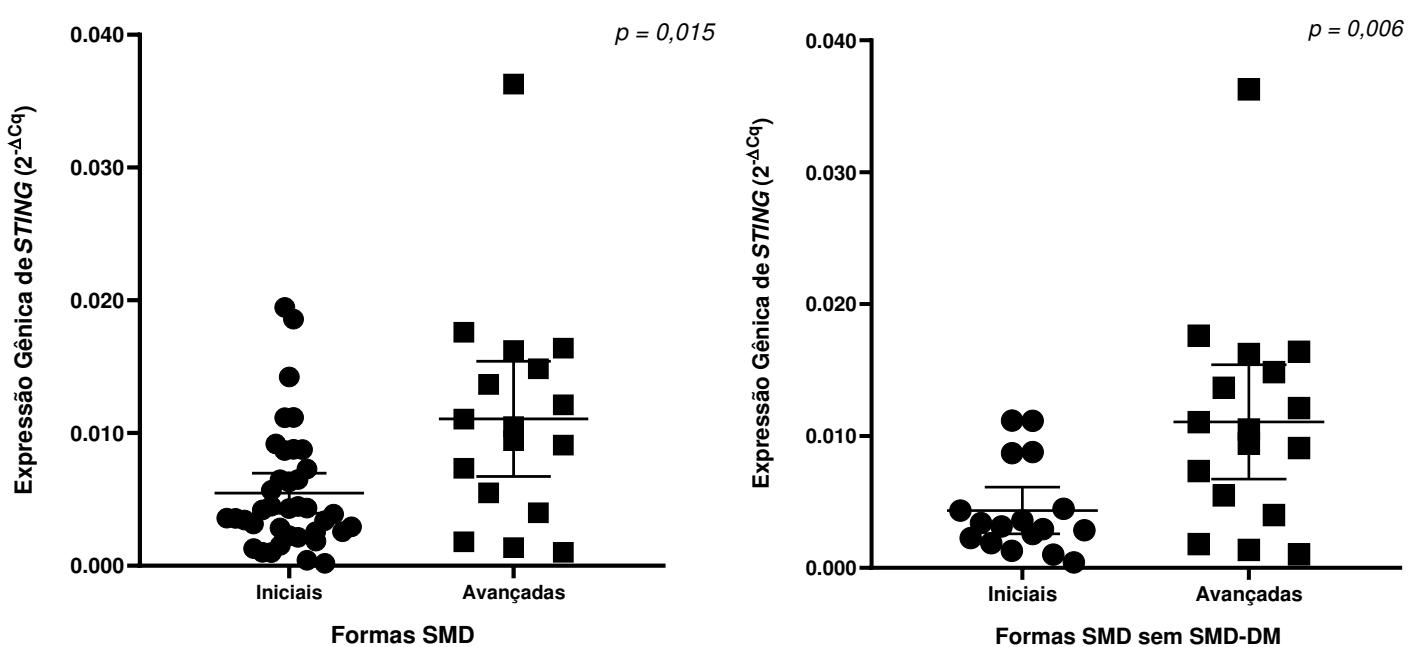
Figura 7 – Nível de expressão do gene *DDX41* em pacientes com SMD frente a categorização em formas iniciais e avançadas



Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Formas SMD	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
Iniciais	39	,005987887	,0035258937	,004844925	,007130850	0,218	0,028
Avançadas	16	,007072909	,0050291989	,006005029	,011364771		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 8 – Nível de expressão do gene *STING* em pacientes com SMD frente a categorização em formas iniciais e avançadas



Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Formas SMD	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney†	
Iniciais	38	,003597700	,0045975041	,003957799	,006980123	0,015	
Avançadas	17	,009956150	,0084354350	,006733670	,015407871		

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

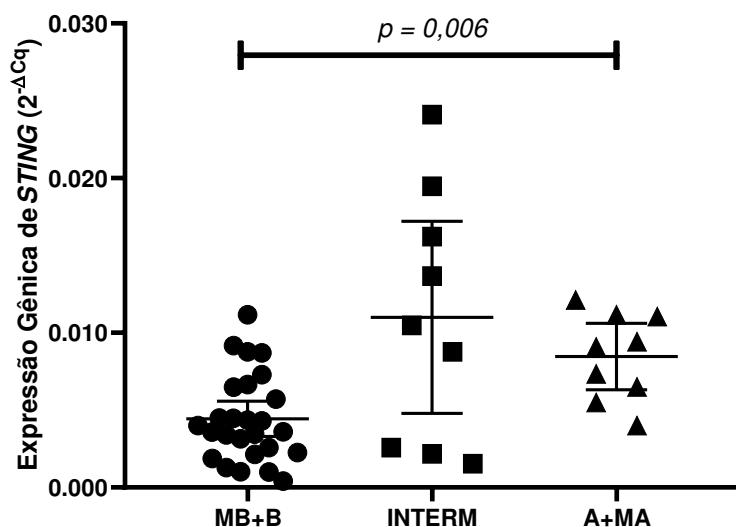
Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Formas SMD sem SMD-DM	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney†
Iniciais	17	,002930700	,0034314386	,002585117	,006113683	0,006
Avançadas	17	,009956150	,0084354350	,006733670	,015407871	

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

4.3.2 Classificação dos Grupos de Risco de acordo com o IPSS-R

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R, não foram observadas diferenças nas expressões dos genes *DDX41* e *STING* entre os grupos de risco do IPSS-R (muito baixo risco, baixo risco, intermediário, alto risco, muito alto risco) (Apêndice A). Em contrapartida, ao agruparmos os grupos de risco em três categorias: muito baixo + baixo, intermediário e muito alto + alto, observamos maior expressão de *STING* nos pacientes incluídos na categoria muito alto + alto risco quando comparados aos pacientes incluídos na categoria muito baixo + baixo risco ($p = 0,004$) (Figura 9).

Figura 9 – Nível de expressão do gene *STING* em pacientes com SMD frente a categorização do IPSS-R



Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
IPSS-R categorizado	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell
MB+B	26	,004433862	,0028173525	,003295908	,005571815			0,006
INTERM	9	,010998678	,0080749752	,004791702	,017205653	0,001†	0,000	-
A+MA	9	,008466578	,0027969425	,006316657	,010616498			0,006

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

4.4 Expressão gênica de *DDX41* e *STING* em pacientes com dependência transfusional

Não encontramos associações significativas entre o nível de expressão dos genes *DDX41* e *STING* e a variável dependência transfusional ($p > 0,05$) (Apêndice A).

4.5 Expressão gênica de *DDX41* e *STING* em relação à evolução para LMA

Não encontramos associações significativas entre o nível de expressão dos genes estudados e a variável evolução para LMA ($p > 0,05$) (Apêndice A).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os níveis de expressão de 2 genes com papéis na regulação imune inata do hospedeiro em 73 pacientes portadores de SMD correlacionando-os com variáveis clínicas e laboratoriais.

A sinalização imune inata crônica em células hematopoiéticas é bastante descrita em SMD e a superexpressão de genes relacionados ao sistema imunológico em células-tronco hematopoéticas é relatada em 50% dos pacientes. Dessa forma, percebe-se que a ativação do sistema imune inato, predominantemente por meio de receptores de reconhecimento de padrão, aumenta o risco de desenvolver SMD (PELLAGATTI *et al.*, 2010; BARREYRO *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, observamos em nossa coorte que pacientes com SMD apresentavam, em algumas situações, níveis elevados de expressão gênica de dois receptores de padrão de reconhecimento: *DDX41* e *STING*.

A capacidade do DNA citosólico, exógeno ou não, estimular o sistema imune já é conhecida há muito tempo, porém, apenas na última década pesquisas começaram a descrever a base molecular dessa detecção pelo sistema imune inato. Diversos receptores citosólicos foram descritos até então, mas *STING* tem mostrado um papel chave para a maioria das vias de detecção (PALUDAN; BOWIE, 2013). Esse destaque que *STING* apresenta está relacionado as suas duas formas de atuação: seja como um sensor direto de di-nucleotídeos cíclicos (CDNs) derivados de bactérias ou como adaptador de outros receptores (TANAKA; CHEN, 2012; RAN *et al.*, 2014). *DDX41* entra na lista de receptores de dsDNA que podem ativar *STING*.

Pacientes com formas avançadas de SMD apresentaram maior expressão de *DDX41* e *STING* quando comparado aos pacientes com formas iniciais da doença. A SMD inicial é caracterizada por um aumento da apoptose e hematopoese ineficiente, ocasionadas por alterações no microambiente medular, na secreção de citocinas e no sistema imune inato. Essas mudanças promovem a supressão das células saudáveis, provocando a presença de citopenias periféricas. Em contrapartida, na SMD avançada há o aumento progressivo de blastos na medula óssea, ocorrem falhas nos mecanismos de reparo, mutações adicionais na células-tronco hematopoiéticas e, além disso, o clone displásico adquire resistência à apoptose e vantagem proliferativa, o que traz risco aumentado de transformação para LMA (GHOBRIAL *et al.*, 2018). A via estabelecida por *DDX41* e *STING* culmina com a ativação de fatores de transcrição como *IRF3* e *NF-κB* (ZHANG *et al.*, 2011; ABE; BARBER, 2014). Por

SMD ser considerada uma doença com lesão no DNA, a liberação de dsDNA no citoplasma celular pode estimular a ativação imunológica da via estudada.

A via de NF-κB pode ser acionada por danos ao DNA e sua ativação desencadeia fatores anti-apoptóticos. Somado a isso, estudos sugerem que esse fator de transcrição controla atividades de proliferação, auto renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas. Em SMD, observou-se que uma maior expressão de NF-κB está relacionada a expressão de citocinas inflamatórias e fatores pró-sobrevivência, resultando em hematopoiese desregulada (BRAUN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2018). Dessa forma, a maior expressão dos genes estudados em pacientes com SMD avançada pode estar resultando no aumento de NF-κB, o que contribui com fenótipo de maior resistência à apoptose observado nesses pacientes.

Quando analisamos a expressão de *DDX41* e *STING* em relação aos subtipos da doença segundo a OMS 2016, novamente observamos resultados que indicam uma maior expressão desses genes em pacientes com características mais agressivas da SMD. Para *DDX41*, pacientes classificados com SMD-EB2 (SMD com excesso de blastos II) apresentaram níveis de expressão mais altos do que pacientes com SMD-DM (SMD com displasia Multilinhagem). Já para *STING*, pacientes com SMD-EB1 (SMD com excesso de blasto I) apresentaram maiores níveis de expressão do que pacientes com SMD-SA (SMD com Sideroblastos em anel). Corroborando com esse resultado, os pacientes que possuíam contagem de blastos na medula óssea maior do que 10% apresentaram maior expressão de *DDX41* quando comparados aos pacientes que possuíam contagem de blastos $\leq 2\%$ ou de 5%-10%. Ademais, se categorizarmos a porcentagem de blastos em $> 5\%$ ou $< 5\%$ verificamos maior expressão de *DDX41* em pacientes com blastos $> 5\%$. Já *STING* teve expressão aumentada em pacientes que tinham de 5%-10% de blastos na medula em comparação a pacientes com contagem de blastos $\leq 2\%$. Os blastos são precursores hematopoiéticos com proliferação e maturação bem caracterizadas, de forma que a presença em excesso na medula ou sangue periférico caracteriza uma disfunção no processo normal de hematopoiese. Essa disfunção da hematopoiese resulta no bloqueio da diferenciação celular e acúmulo de blastos defeituosos, estimulando ativação de *DDX41*.

Além da via do NF-κB, o fator de regulação de interferon 3 (IRF3) também pode ser desencadeado pela via *DDX41-STING*. Dois estudos do nosso grupo, utilizando duas coortes diferentes, verificaram maior expressão de *IRF3* em características de prognóstico desfavorável para SMD: formas mais avançadas da doença, presença de anormalidades cromossômicas, maior contagem de blastos, menor contagem de plaquetas e necessidade de

dependência transfusional. Esses achados indicam uma relação entre *IRF3*, ativação imunológica e instabilidade genômica na SMD (DE SOUSA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Utilizando o banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), um estudo de Xiang An e colaboradores verificou o aumento de expressão de *STING*, *TBK1*, *IRF3* e *cGAS*, outra molécula capaz de acionar *STING*, em 18 tipos de câncer. A maior expressão da via do *STING* em diversos tipos de câncer está relacionada com a instabilidade genômica das células cancerígenas e o reconhecimento de dsDNA no citoplasma (AN *et al.*, 2019).

Nosso estudo também observou que outros marcadores de prognóstico desfavorável em SMD, como maior número de citopenias e pior índice de escore prognóstico (IPSS-R), apresentaram maior expressão de *STING*. Pacientes que apresentavam três citopenias tinham maior expressão de *STING* do que aqueles que apresentavam uma citopenia e pacientes que possuíam escore de risco alto e muito alto expressavam mais *STING* do que pacientes com escore de risco muito baixo e baixo. As citopenias possuem um papel importante no cálculo do IPSS-R e, junto com a contagem de blastos e o resultado de cariótipo, determinam o tempo de sobrevida e o risco de transformação para LMA que o paciente possui naquele determinado momento.

Recentemente, um estudo do nosso grupo conduzido por Oliveira e colaboradores observou que o aumento de expressão de retrovírus endógenos em pacientes com SMD estaria levando a uma maior expressão do receptor toll-like 3 (*TLR3*) (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Os retrovírus endógenos são artefatos de infecções antigas que afetaram a linhagem germinativa dos primatas e se caracterizam por serem elementos repetitivos no genoma humano que, quando expressos, podem ser considerados como PAMPs pelo organismo (CHIAPPINELLI *et al.*, 2015). O RNA do retrovírus é convertido pela enzima transcriptase reversa viral (RT) primeiro em híbridos de RNA/DNA usando um tRNA para iniciar a síntese de DNA e depois em DNA de fita dupla (dsDNA). Stavrou e colaboradores demonstraram que *DDX41* reconhece fragmentos retrovirais de RNA/DNA e é crítico para o controle *in vivo* da infecção pelo vírus da leucemia murina (STAVROU *et al.*, 2018). É possível que a expressão desses retrovírus endógenos ocasione uma resposta de *DDX41* e acione a cascata *STING* em pacientes com SMD.

Sabe-se que há diversos marcadores moleculares associados à patogênese da SMD (ARBER, 2016). Neste contexto, conclui-se que a expressão dos genes *DDX41* e *STING* são importantes para a compreensão da fisiopatologia da SMD, especialmente quando estes apresentam maior expressão em variáveis de prognóstico desfavorável, podendo relacioná-los com a progressão da doença. Estudos futuros e complementares são necessários para

confirmar esta hipótese e entender melhor o mecanismo dessa ativação na SMD, haja vista que o sistema imune inato é modulado por diversos componentes intrínsecos e extrínsecos.

6 CONCLUSÃO

A desregulação dos genes *DDX41* e *STING* pode estar associada à patogênese da SMD. Ambos os genes apresentaram maiores níveis de expressão em características de prognóstico desfavorável na doença, o que pode ser resultado de uma estimulação imunológica crônica da via *DDX41-STING* em pacientes com SMD. Assim, estes genes podem ser alvos potenciais em novas pesquisas com foco em imunoterapia e evolução da doença.

- I. *DDX41* e *STING* apresentaram maior expressão em pacientes com maior porcentagem de blastos na medula óssea;
- II. Pacientes com formas mais avançadas da SMD apresentaram maiores níveis de *DDX41* e *STING*;
- III. *DDX41* e *STING* estavam mais expressos em pacientes com subtipos mais agressivos de SMD de acordo com a classificação da OMS;
- IV. Pacientes com três citopenias apresentaram maior expressão de *STING* do que pacientes com uma citopenia;
- V. *STING* estava mais expressos em pacientes classificados com de alto risco e muito alto risco em comparação aos pacientes de baixo risco e muito baixo risco.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, Lionel; ITZYKSON, Raphael; FENAUX, Pierre. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239-2252, 2014.
- ABE, Takayuki; BARBER, Glen N. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-κB activation through TBK1. **Journal of virology**, v. 88, n. 10, p. 5328-5341, 2014.
- AHN, Jeonghyun et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 47, p. 19386-19391, 2012.
- AHN, Jeonghyun et al. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.
- AHN, J.; KONNO, H.; BARBER, G. N. Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 41, p. 5302-5308, 2015.
- ALTER, Blanche P. Fanconi anemia and the development of leukemia. **Best practice & research Clinical haematology**, v. 27, n. 3-4, p. 214-221, 2014.
- AMARANTE-MENDES, Gustavo P. et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2379, 2018.
- AN, Xiang et al. An analysis of the expression and association with immune cell infiltration of the cGAS/STING pathway in pan-cancer. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 14, p. 80-89, 2019.
- ARBER, Daniel A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.
- AUL, C.; GIAGOUDIS, A.; GERMING, U. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. **International journal of hematology**, v. 73, n. 4, p. 405-410, 2001.
- BARREYRO, Laura; CHLON, Timothy M.; STARCZYNOWSKI, Daniel T. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 132, n. 15, p. 1553-1560, 2018.
- BASIORKA, Ashley A. et al. The NLRP3 inflammasome functions as a driver of the myelodysplastic syndrome phenotype. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 128, n. 25, p. 2960-2975, 2016.
- BEHAM-SCHMID, Christine; SCHMITT-GRAEFF, Annette. Myelodysplastic Syndromes (MDS). In: **Bone Marrow Biopsy Pathology**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2020. p. 343-381.
- BEJAR, Rafael et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2496-2506, 2011.

BEJAR, Rafael; LEVINE, Ross; EBERT, Benjamin L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 5, p. 504, 2011002E

BEJAR, Rafael. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 99, n. 6, p. 956, 2014.

BEJAR, Rafael; GREENBERG, Peter L. The impact of somatic and germline mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 15, n. 1, p. 131-135, 2017.

BELLI, Carolina B. et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American journal of hematology**, v. 90, n. 10, p. 851-858, 2015.

BENNETT, John M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British journal of haematology**, v. 51, n. 2, p. 189-199, 1982.

BERNASCONI, Paolo et al. Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. **American journal of hematology**, v. 88, n. 2, p. 120-129, 2013.

BERNARD, Elsa et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1549-1556, 2020.

BRAUN, Thorsten et al. NF-κB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1156-1165, 2006.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

CANESE, M. C. C. et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. **Mucosal immunology**, v. 11, n. 3, p. 820-834, 2018.

CAZZOLA, Mario. Myelodysplastic syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 14, p. 1358-1374, 2020.

COGLE, Christopher R. et al. Incidence of the myelodysplastic syndromes using a novel claims-based algorithm: high number of uncaptured cases by cancer registries. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 26, p. 7121-7125, 2011.

COGLE, Christopher R. Incidence and burden of the myelodysplastic syndromes. **Current hematologic malignancy reports**, v. 10, n. 3, p. 272-281, 2015.

CHAMSEDDINE, Ali N. et al. Unraveling myelodysplastic syndromes: current knowledge and future directions. **Current oncology reports**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2016.

CHIAPPINELLI, Katherine B. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 974-986, 2015.

CHEAH, Jesse JC et al. Myeloid neoplasms with germline DDX41 mutation. **International journal of hematology**, v. 106, n. 2, p. 163-174, 2017.

CHUNG, Stephen S.; PARK, Christopher Y. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. **Blood advances**, v. 1, n. 26, p. 2572-2578, 2017.

DE MATOS, Anacélia Gomes et al. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome. **Medical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 1-7, 2017.

DE OLIVEIRA, Roberta Taiane Germano et al. ERVs-TLR3-IRF axis is linked to myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Medical Oncology**, v. 38, n. 3, p. 1-12, 2021.

DÖHNER, Hartmut; WEISDORF, Daniel J.; BLOOMFIELD, Clara D. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

DUPLOYEZ, Nicolas et al. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with genetic predispositions: a new challenge for hematologists. **Expert review of hematology**, v. 9, n. 12, p. 1189-1202, 2016.

ELINAV, Eran et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759-771, 2013.

GADJI, Macoura; POZZO, Aline Rangel. From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 7, p. 474-483, 2019.

GAÑÁN-GÓMEZ, I. et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 29, n. 7, p. 1458-1469, 2015.

GANGAT, Naseema; PATNAIK, Mrinal M.; TEFFERI, Ayalew. Myelodysplastic syndromes: contemporary review and how we treat. **American journal of hematology**, v. 91, n. 1, p. 76-89, 2016.

GARCIA-MANERO, Guillermo. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. **American journal of hematology**, v. 90, n. 9, p. 831-841, 2015.

GHOBRIAL, Irene M. et al. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: implications for AML and MM. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 4, p. 219-233, 2018.

GREENBERG, Peter et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 89, n. 6, p. 2079-2088, 1997.

GREENBERG, Peter L. et al. Myelodysplastic syndromes, version 2.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 15, n. 1, p. 60-87, 2017.

- HAFERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241-247, 2014.
- HERMAN, A. C. et al. Systemic TLR2 agonist exposure regulates hematopoietic stem cells via cell-autonomous and cell-non-autonomous mechanisms. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 6, p. e437-e437, 2016.
- HOFMANN, Inga. Pediatric myelodysplastic syndromes. In: **Bone Marrow Failure**. Springer, Cham, 2018. p. 57-79.
- HOSONO, Naoko. Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. **International journal of clinical oncology**, v. 24, n. 8, p. 885-892, 2019.
- ISHIKAWA, Hiroki; BARBER, Glen N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 674-678, 2008.
- ISHIKAWA, Hiroki; MA, Zhe; BARBER, Glen N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 788-792, 2009.
- JANKOWSKY, Eckhard. RNA helicases at work: binding and rearranging. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 1, p. 19-29, 2011.
- JIANG, Yan et al. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. **Protein & cell**, v. 8, n. 2, p. 83-89, 2017.
- JIANG, Minlin et al. cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2020.
- JONAS, Brian A.; GREENBERG, Peter L. MDS prognostic scoring systems—past, present, and future. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 28, n. 1, p. 3-13, 2015.
- KING, Kevin R. et al. IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. **Nature medicine**, v. 23, n. 12, p. 1481-1487, 2017.
- KOEFFLER, H. P.; LEONG, G. Preleukemia: one name, many meanings. **Leukemia**, v. 31, n. 3, p. 534-542, 2017.
- LEE, Eun-Ju et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood reviews**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2016.
- LIU, Siqi et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. **Science**, v. 347, n. 6227, 2015.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MA, Xiaomei. Epidemiologia das síndromes mielodisplásicas. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 7, p. S2-S5, 2012.

MAGALHAES, Silvia MM et al. Epidemiological and clinicopathological data from the Brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 1884, 2010.

MAGALHÃES, Silvia Maria Meira et al. Guidelines on myelodysplastic syndromes: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 40, p. 255-261, 2018.

MALCOVATI, Luca et al. The Effect of Transfusion Dependency and Secondary Iron Overload on Survival of Patients with Myelodysplastic Syndrome. **Blood**, v. 106, n. 11, p. 791, 2005.

MALCOVATI, Luca et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. **Blood**, v. 136, n. 2, p. 157-170, 2020.

MCGOWAN-JORDAN, Jean (Ed.). **ISCN 2016: An international system for human cytogenomic nomenclature (2016); recommendations of the international standing human committee on human cytogenomic nomenclature including new sequence-based cytogenomic**. Karger, 2016.

MOHAMMAD, Amrallah A. Myelodysplastic syndrome from theoretical review to clinical application view. **Oncology reviews**, v. 12, n. 2, 2018.

NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, W. W. Myelodysplastic Syndromes. **Hematopathology–Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics and Molecular Approaches, 1st Edition**. USA: Academic Press Publication, p. 129-154, 2008.

NEUKIRCHEN, Judith et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leukemia research**, v. 35, n. 12, p. 1591-1596, 2011.

OMURA, Hiroki et al. Structural and Functional Analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

PALUDAN, Søren R.; BOWIE, Andrew G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 870-880, 2013.

PAPAEMMANUIL, Elli et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 22, p. 3616-3627, 2013.

PARVATIYAR, Kislay et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. **Nature immunology**, v. 13, n. 12, p. 1155-1161, 2012.

PELLAGATTI, A. et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 756-764, 2010.

PERAZZIO, Aline dos Santos Borgo; CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes L. Ferrari. When

karyotype is decisive for myelodysplastic syndromes diagnosis. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 41, p. 371-373, 2019.

PFEILSTÖCKER, Michael et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 128, n. 7, p. 902-910, 2016.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, Maria de Lourdes Lopes Ferrari. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1110-1112, 2009.

PLATZBECKER, Uwe et al. Current challenges and unmet medical needs in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, p. 1-17, 2021.

POLPRASERT, Chantana et al. Inherited and somatic defects in DDX41 in myeloid neoplasms. **Cancer cell**, v. 27, n. 5, p. 658-670, 2015.

QUESADA, Andrés E. et al. DDX41 mutations in myeloid neoplasms are associated with male gender, TP53 mutations and high-risk disease. **American journal of hematology**, v. 94, n. 7, p. 757-766, 2019.

RAN, Yong; SHU, Hong-Bing; WANG, Yan-Yi. MITA/STING: a central and multifaceted mediator in innate immune response. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 6, p. 631-639, 2014.

RAZA, Azra; IVERSON, Nicholas; ALI, Abdullah M. Developments in the treatment of transfusion-dependent anemia in patients with myelodysplastic syndromes: epidemiology, etiology, genetics, and targeted therapies. **Advances in Genomics and Genetics**, v. 4, p. 95, 2014.

RIBEIRO, Howard L. et al. DNA repair gene expressions are related to bone marrow cellularity in myelodysplastic syndrome. **Journal of clinical pathology**, v. 70, n. 11, p. 970-980, 2017.

SALLMAN, David A.; LIST, Alan. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 10, p. 1039-1048, 2019.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SHEKARIAN, T. et al. Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1756-1766, 2017.

SILVERMAN, Lewis R. The myelodysplastic syndrome. **Holland-Frei Cancer Medicine**, p. 1-18, 2016.

SLACK, Jonathan et al. Incidence of Myelodysplastic Syndromes in a Major Canadian Metropolitan Area. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 378-383,

2018.

SLITER, Danielle A. et al. Parkin e PINK1 mitigam a inflamação induzida por STING. **Nature**, v. 561, n. 7722, pág. 258-262, 2018.

STAVROU, Spyridon et al. DDX41 recognizes RNA/DNA retroviral reverse transcripts and is critical for in vivo control of murine leukemia virus infection. **MBio**, v. 9, n. 3, p. e00923-18, 2018.

STROM, Sara S.; VÉLEZ-BRAVO, Vivianne; ESTEY, Elihu H. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2008. p. 8-13.

SWERDLOW, S. H. et al. WHO classification of MDS. **World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, France: IARC Press, 2008.

SWERDLOW, Steven H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 127, n. 20, p. 2375-2390, 2016.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TANAKA, Yasuo; CHEN, Zhijian J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. **Science signaling**, v. 5, n. 214, p. ra20-ra20, 2012.

TOBIASSON, M.; KITTANG, A. O. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. **Journal of internal medicine**, v. 286, n. 1, p. 41-62, 2019.

THE, I. C. G. C. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes. **Nature**, v. 578, n. 7793, p. 82, 2020.

VAIRO, Filippo Pinto e et al. Novel germline missense DDX41 variant in a patient with an adult-onset myeloid neoplasm with excess blasts without dysplasia. **Leukemia & lymphoma**, v. 60, n. 5, p. 1337-1339, 2019.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

VARDIMAN, James W.; HARRIS, Nancy Lee; BRUNNING, Richard D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 100, n. 7, p. 2292-2302, 2002.

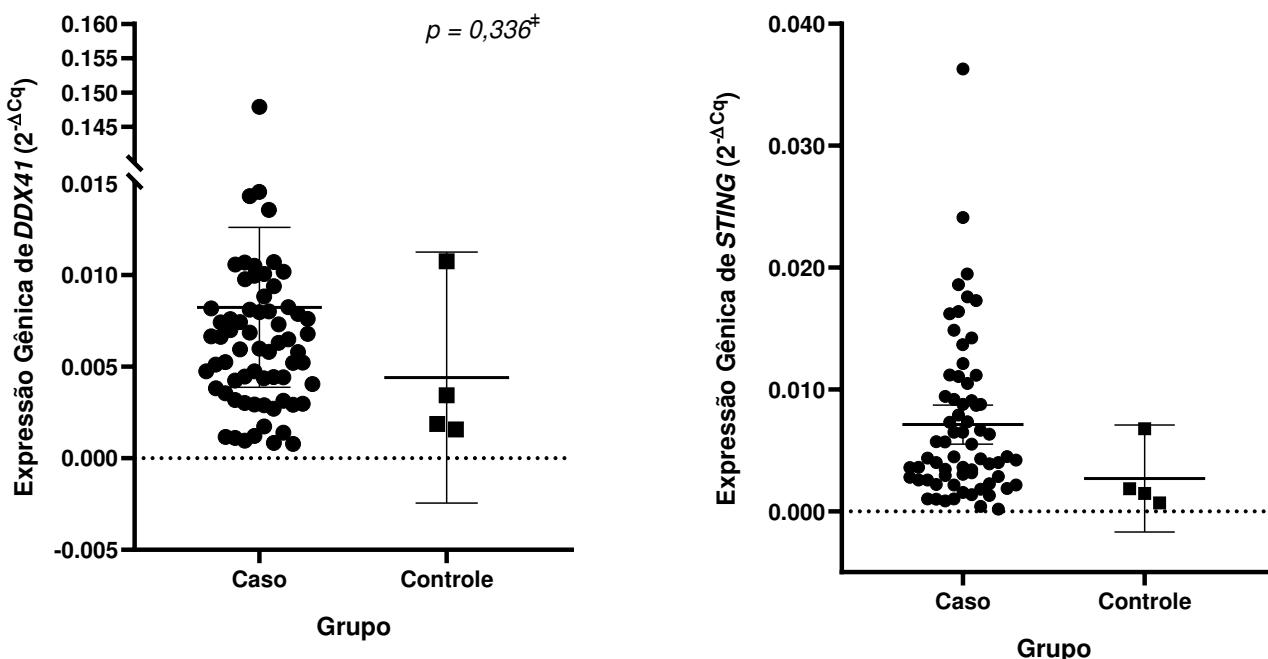
VASSALLO, José; MAGALHÃES, Silvia MM. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 267-272, 2009.

WALL, Meaghan. Recurrent cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Cancer Cytogenetics**, p. 209-222, 2017.

- WALTER, Dagmar et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 549-552, 2015.
- WAN, Ziqi; HAN, Bing. Clinical features of DDX41 mutation-related diseases: a systematic review with individual patient data. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 12, p. 20406207211032433, 2021.
- WANG, Cong et al. Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 122, p. 123-132, 2018.
- WEINBERG, Olga K.; HASSERJIAN, Robert P. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes☆. In: **Seminars in hematatology**. WB Saunders, 2019. p. 15-21.
- WESTERMANN, Jörg; BULLINGER, Lars. Precision medicine in myeloid malignancies. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2021.
- WINTER, Susann et al. Integrating the" Immunome" in the Stratification of Myelodysplastic Syndromes and Future Clinical Trial Design: Systems immunology; a way forward in MDS. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15, p. 1723-1735, 2020.
- ZEIDAN, Amer M. et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. **Blood reviews**, v. 34, p. 1-15, 2019.
- ZENG, Qing et al. Apoptosis in human myelodysplastic syndrome CD34+ cells is modulated by the upregulation of TLRs and histone H4 acetylation via a β -arrestin 1 dependent mechanism. **Experimental cell research**, v. 340, n. 1, p. 22-31, 2016.
- ZINDEL, Joel; KUBES, Paul. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, p. 493-518, 2020.
- ZHANG, Zhiqiang et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. **Nature immunology**, v. 12, n. 10, p. 959-965, 2011.
- ZHAO, Qinglan et al. STING signaling promotes inflammation in experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 154, n. 6, p. 1822-1835. e2, 2018.
- ZHOU, Ting et al. Potential relationship between inadequate response to DNA damage and development of myelodysplastic syndrome. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 966-989, 2015.

APÊNDICE A – RESULTADOS ESTATISTICAMENTE NÃO SIGNIFICANTES

Figura 1 – Níveis de expressão do *DDX41* e *STING* em relação a variável Grupo

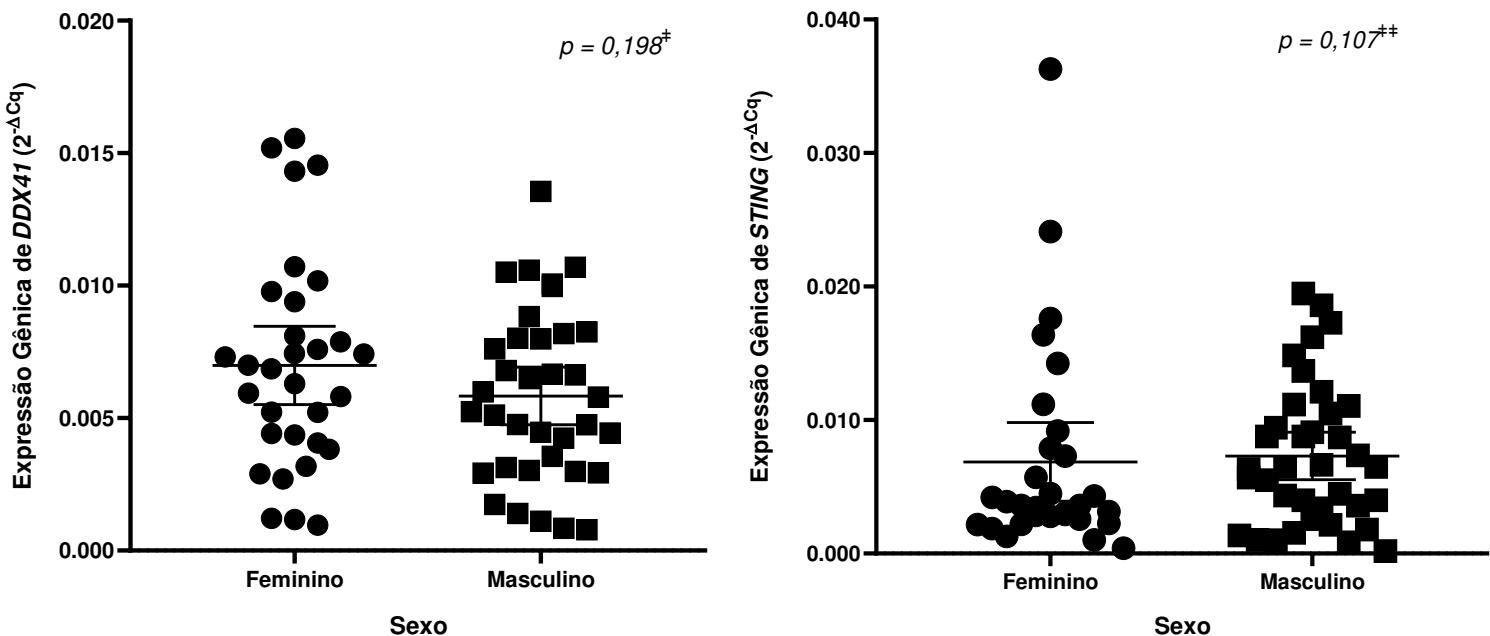


Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Grupo	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor‡
Caso	65	,006089332	,0033155192	,005267787	,006910878	0,620	0,336
Controle	4	,004410150	,0043075517	-,002444126	,011264426		

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Grupo	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney#	
Caso	67	,004473200	,0046262725	,004832342	,007162566	0,627	
Controle	4	,001653950	,0027625552	-,001705067	,007086617		

#Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos

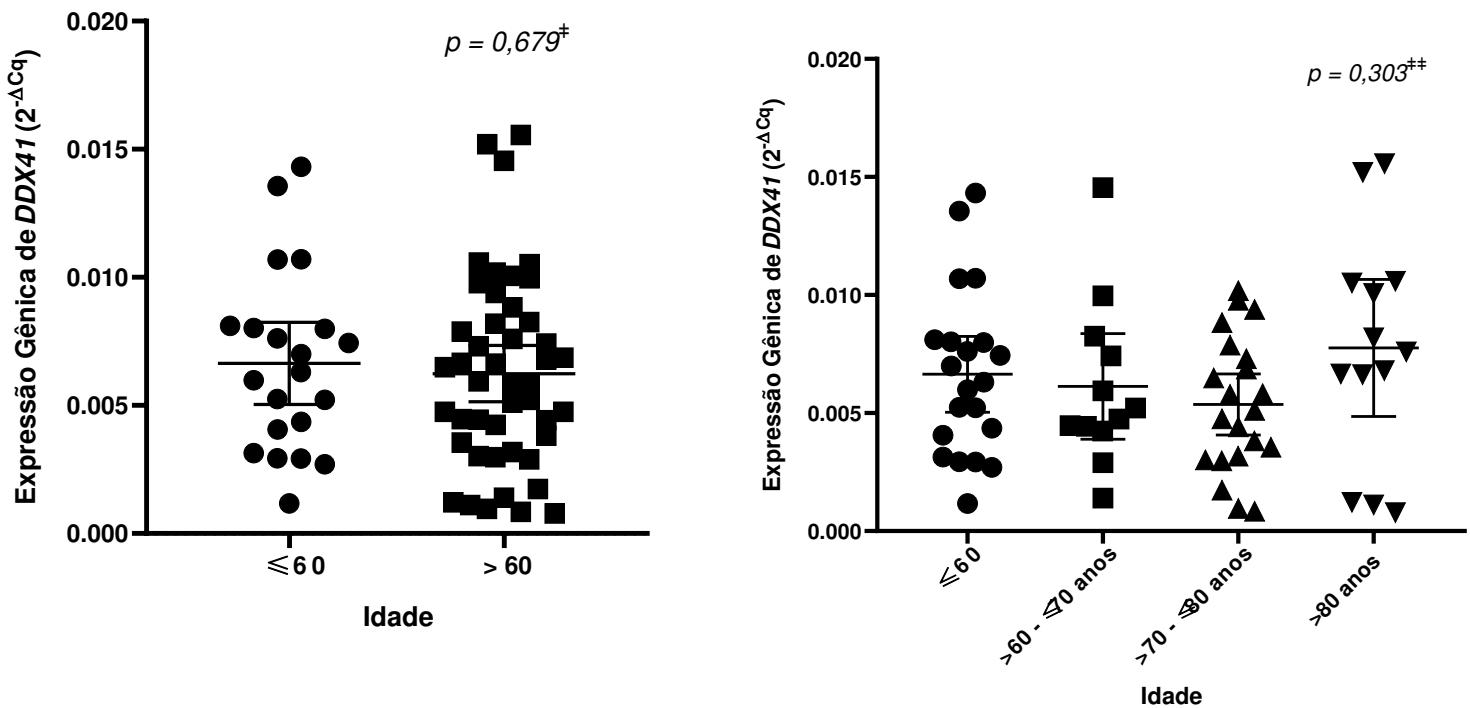
Figura 2 – Níveis de expressão de *DDX41* e *STING* em variáveis relacionadas ao sexo

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Sexo	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
Feminino	31	,006985184	,0040268977	,005508106	,008462262	0,424	0,198
Masculino	36	,005833850	,0032177550	,004745118	,006922582		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Sexo	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney‡
Feminino	30	,003601950	,0078851309	,003919920	,009808633	0,107
Masculino	37	,006484200	,0053318878	,005529420	,009084899	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Figura 3 – Níveis de expressão de *DDX41* em variáveis relacionadas a idade

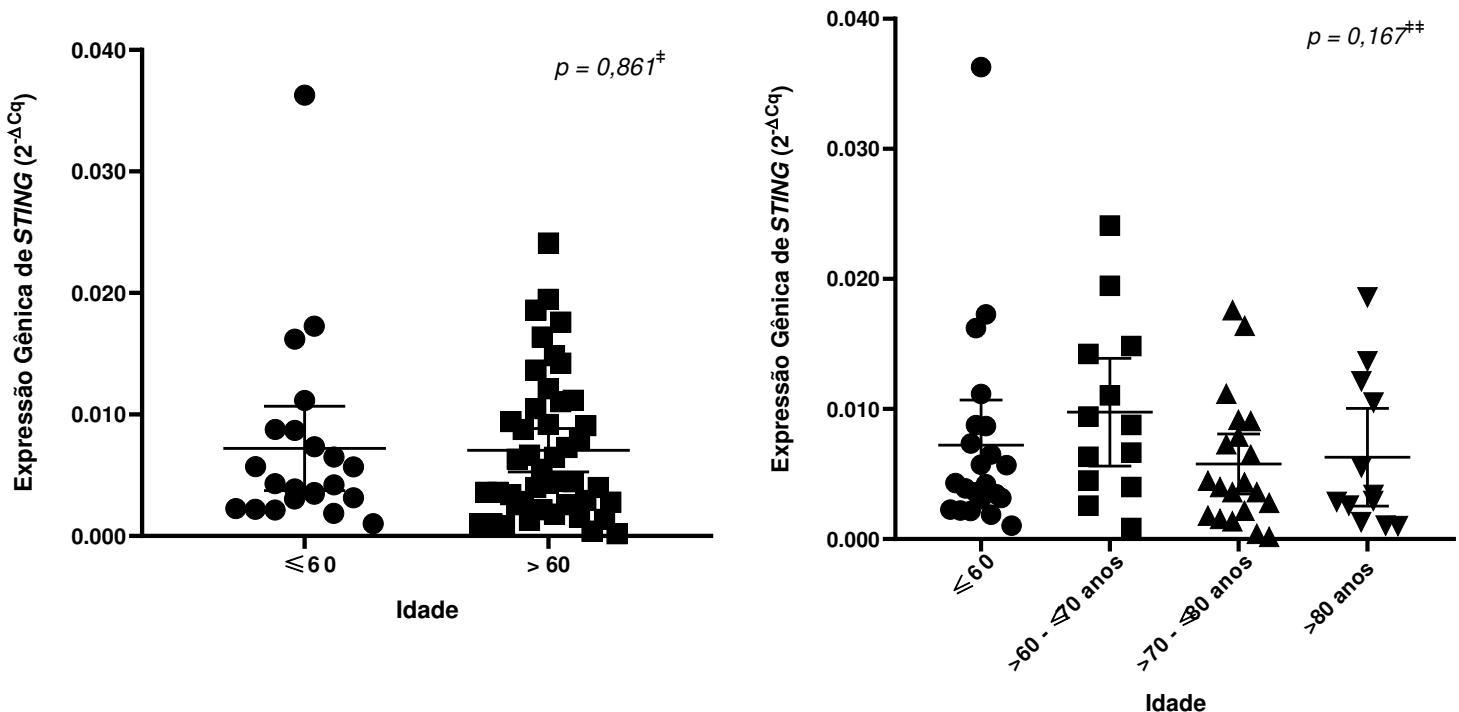
Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Idade	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†	
≤ 60	21	,006641538	,0035278732	,005035669	,008247407	0,777	0,679	
> 60	46	,006241022	,0037109877	,005138994	,007343049			

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Idade IPSS-R	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova#	Teste de Levene	Tukey
≤ 60	21	,006641538	,0035278732	,005035669	,008247407	0,303	0,417	0,979/0,664/0,817
> 60 – 70	12	,006127292	,0035228820	,003888959	,008365624			0,979/0,937/0,673
> 70 – 80	21	,005365995	,0028350514	,004075495	,006656495			0,664/0,937/0,248
> 80	13	,007759508	,0047978870	,004860174	,010658842			0,817/0,673/0,248

#ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Figura 4 – Níveis de expressão de *STING* em variáveis relacionadas a idade categorizada segundo IPSS-R

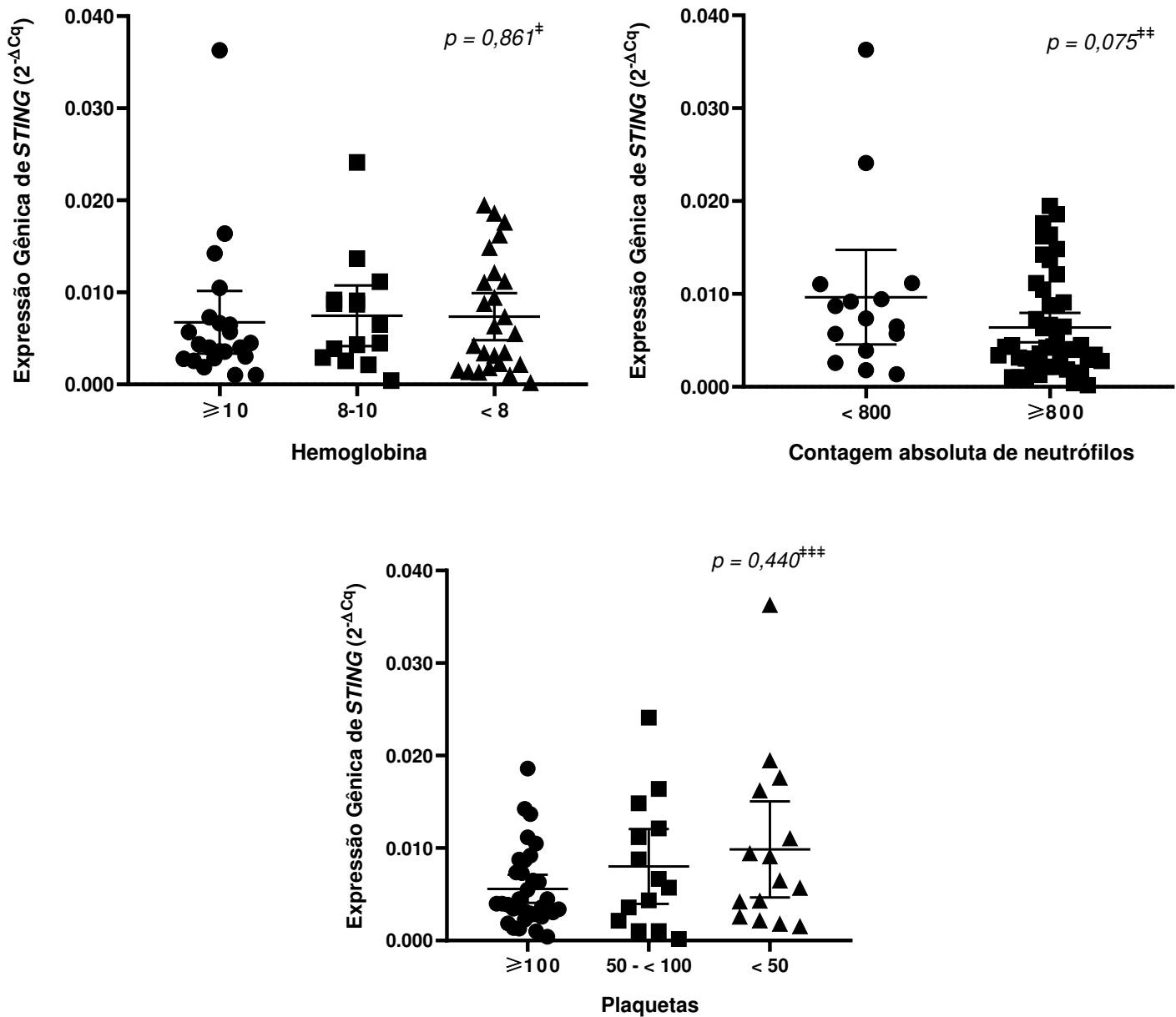


Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Idade	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney†
≤ 60	22	,004256950	,0078229841	,003746742	,010683776	0,861
> 60	45	,004492400	,0059241923	,005277009	,008836658	

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Idade IPSS-R	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis‡
≤ 60	22	,004256950	,0078229841	,003746742	,010683776	0,167
> 60 – 70	13	,008774700	,0068461633	,005615690	,013889880	
> 70 – 80	20	,004174950	,0049366186	,003457466	,008078284	
> 80	12	,003161900	,0059074726	,002531054	,010037912	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Figura 5 – Níveis de expressão de *STING* em variáveis relacionadas ao sangue periférico

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Hemoglobina IPSS-R	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis†
≥10	20	,004174950	,0080043254	,003212550	,010704830	0,861
8-10	17	,006493800	,0056773465	,004203501	,010041546	
< 8	25	,005498900	,0061742088	,004820600	,009917776	

†Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

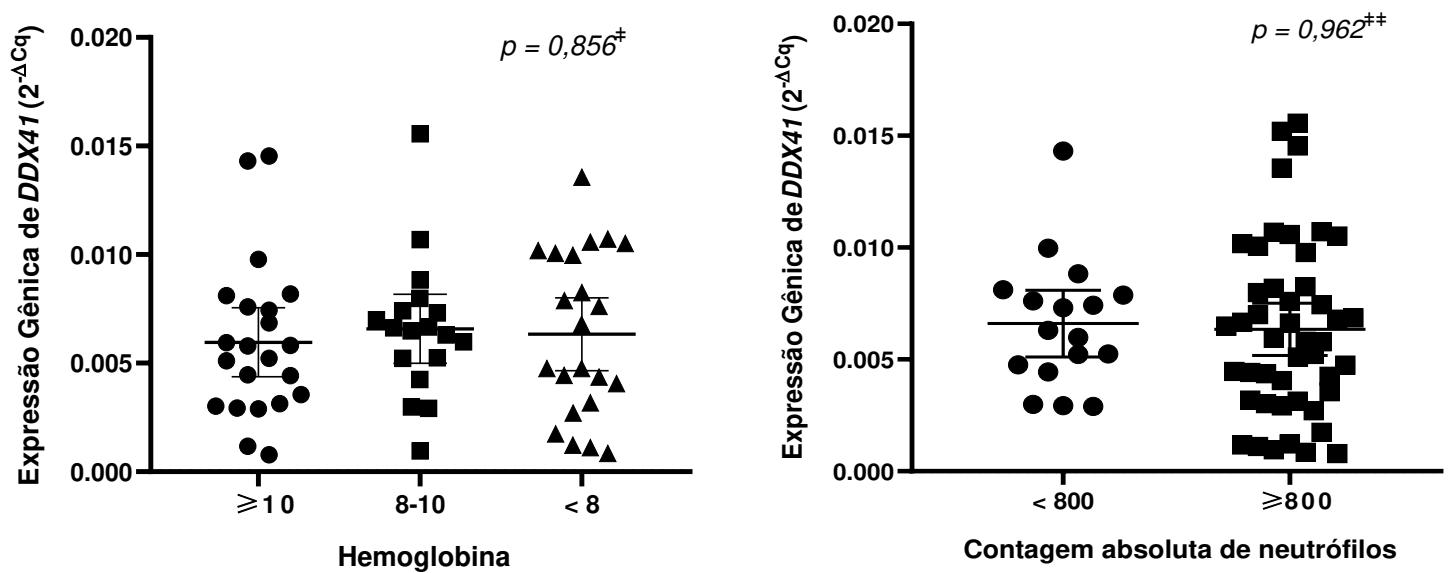
Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
ANC IPSS-R	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney#
< 800	15	,007348400	,0091976413	,004557943	,014744911	0,075
≥ 800	47	,004205900	,0054044635	,004790105	,007963725	

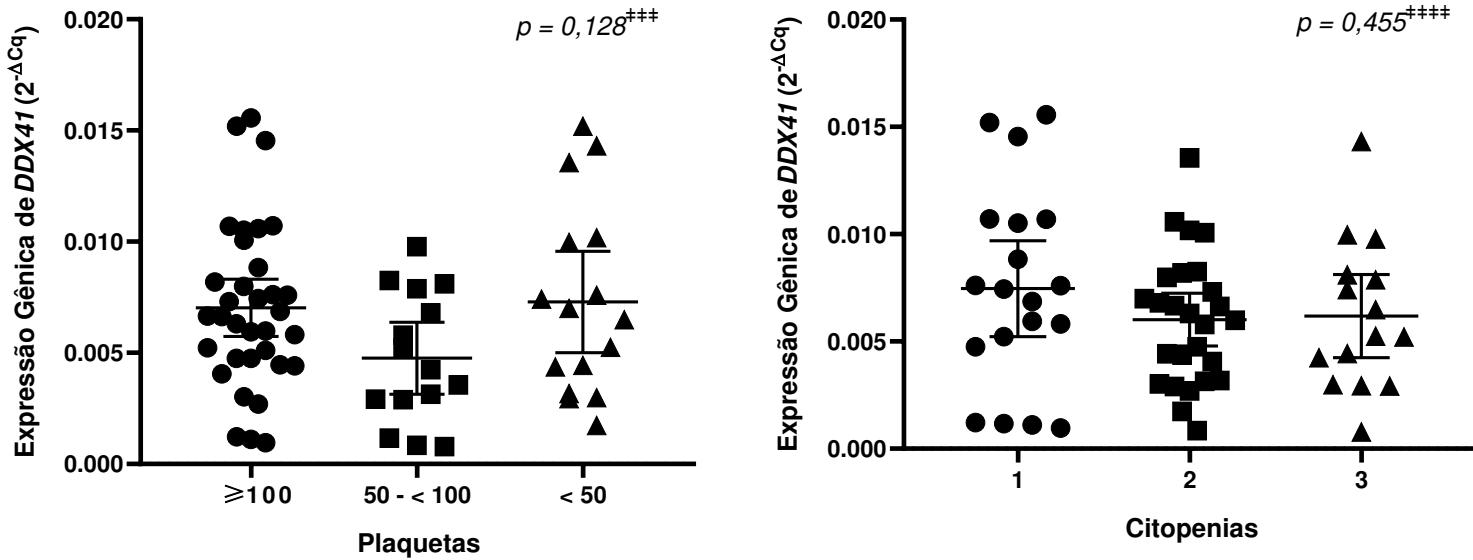
#Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Plaqueta IPSS-R	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis##
≥ 100	33	,003995100	,0042599297	,004080501	,007101511	0,440
50 - 100	14	,006183500	,0070006107	,003963439	,012047504	
< 50	15	,006493800	,0093786025	,004666743	,015054137	

##Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Figura 6 – Níveis de expressão de *DDX41* em variáveis relacionadas ao sangue periférico





Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Hemoglobina IPSS-R	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova†	Teste de Levene	Tukey
≥ 10	22	,005958282	,0035846037	,004368958	,007547606	0,856	0,204	0,848/0,936
8-10	18	,006578233	,0031937502	,004990019	,008166448			0,848/0,974
< 8	22	,006329659	,0037936491	,004647649	,008011669			0,936/0,974

[†]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
ANC IPSS-R	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor#
< 800	16	,006459831	,0029345364	,004896127	,008023535	0,129	0,962
≥ 800	46	,006408439	,0039389290	,005238722	,007578157		

#Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Plaqueta IPSS-R	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova##	Teste de Levene	Tukey

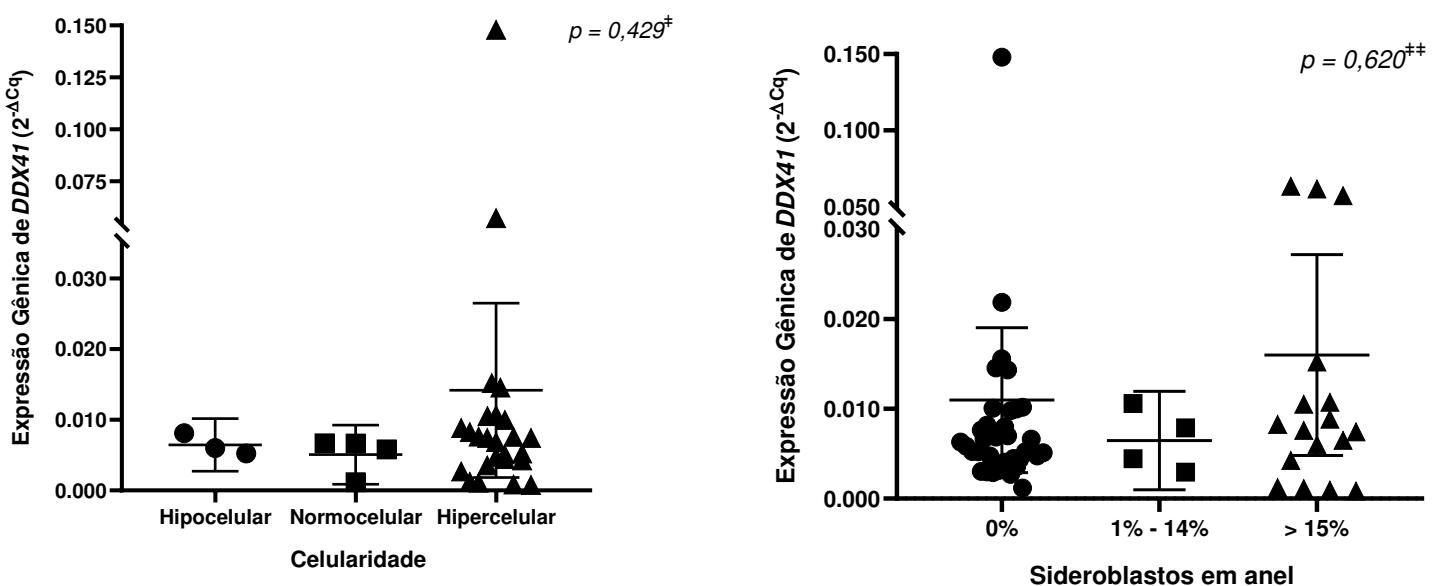
≥ 100	34	,007022821	,0036836273	,005737542	,008308099	0,128	0,674	0,112/0,957
50 - 100	15	,004757407	,0029143671	,003143484	,006371329			0,112/0,319
< 50	14	,006700043	,0039824031	,004400672	,008999414			0,957/0,319

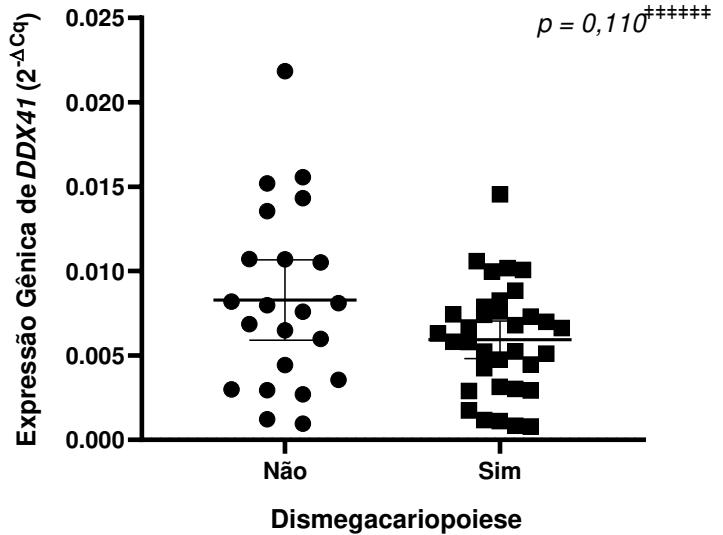
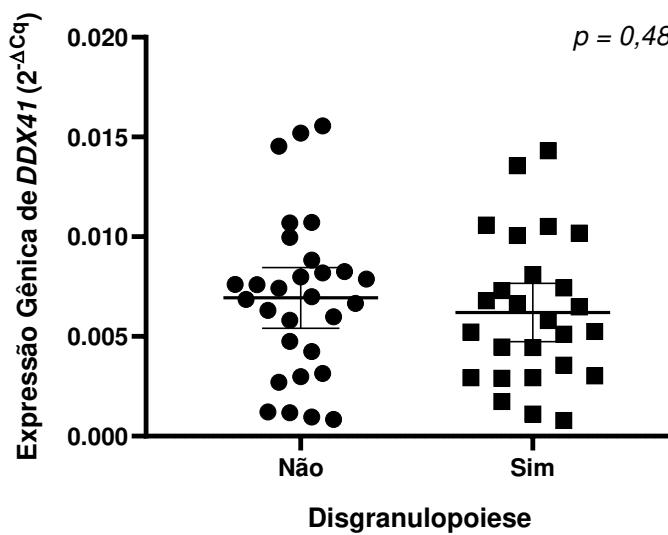
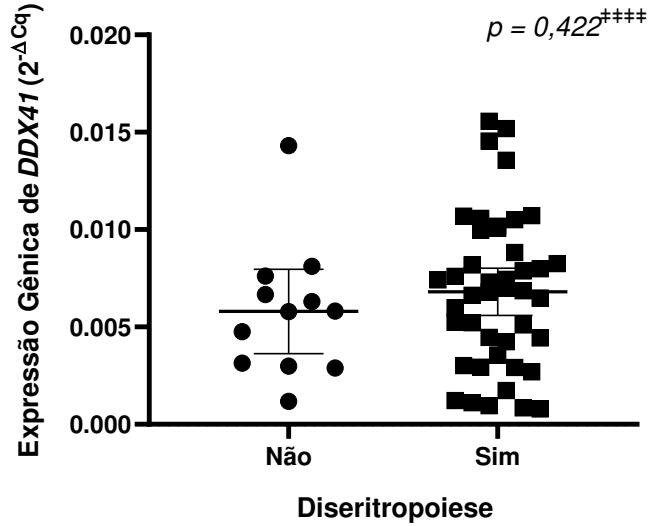
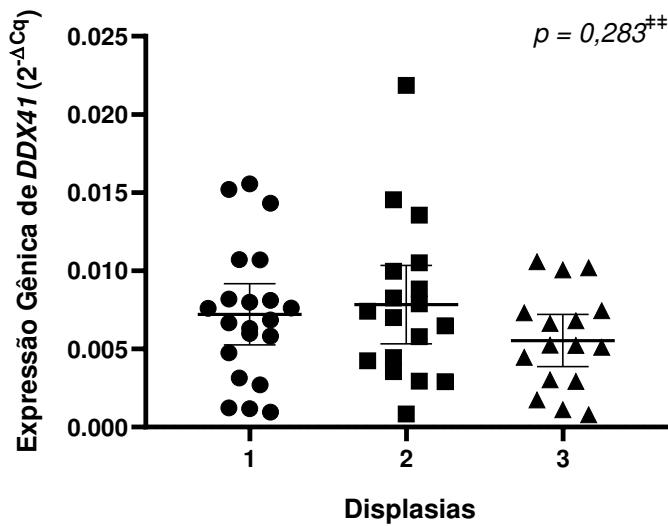
##ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N°: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Citopenias	N°	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova###	Teste de Levene	Tukey
1	20	,007342190	,0045415419	,005216683	,009467697	0,455	0,235	0,454/0,630
2	26	,006013977	,0030396158	,004786250	,007241704			0,454/0,989
3	15	,006180713	,0034921069	,004246849	,008114578			0,630/0,989

##ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. N°: número de casos.

Figura 7 – Níveis de expressão de *DDX41* em variáveis relacionadas aos achados medulares





Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Celularidade	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis‡
Hipocelular	3	,005984900	,0014956828	,002722485	,010153449	0,429
Normocelular	4	,006221200	,0026274414	,000887004	,009248696	
Hipercelular	25	,007416000	,0299033313	,001817100	,026504076	

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Sideroblasto em anel (%)	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis#	
0%	36	,006464300	,0238517760	,002890142	,019030702	,0620	
1% - 14%	4	,006157850	,0034402389	,000983787	,011932163		
> 15%	17	,007592900	,0217604794	,004794947	,027171359		

#Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Displasias	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova##	Teste de Levene	Tukey
1	21	,007214843	,0043015048	,005256821	,009172864	0,283	0,503	,895/0,470
2	18	,007832922	,0050528943	,005320177	,010345667			,895/0,272
3	16	,005537606	,0031441320	,003862217	,007212996			,470/0,272

##ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Diseritropoiese	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor##	
Não	12	,005795308	,0034124605	,003627134	,007963482	0,335	0,422	
	43	,006806812	,0039295174	,005597485	,008016139			

##Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

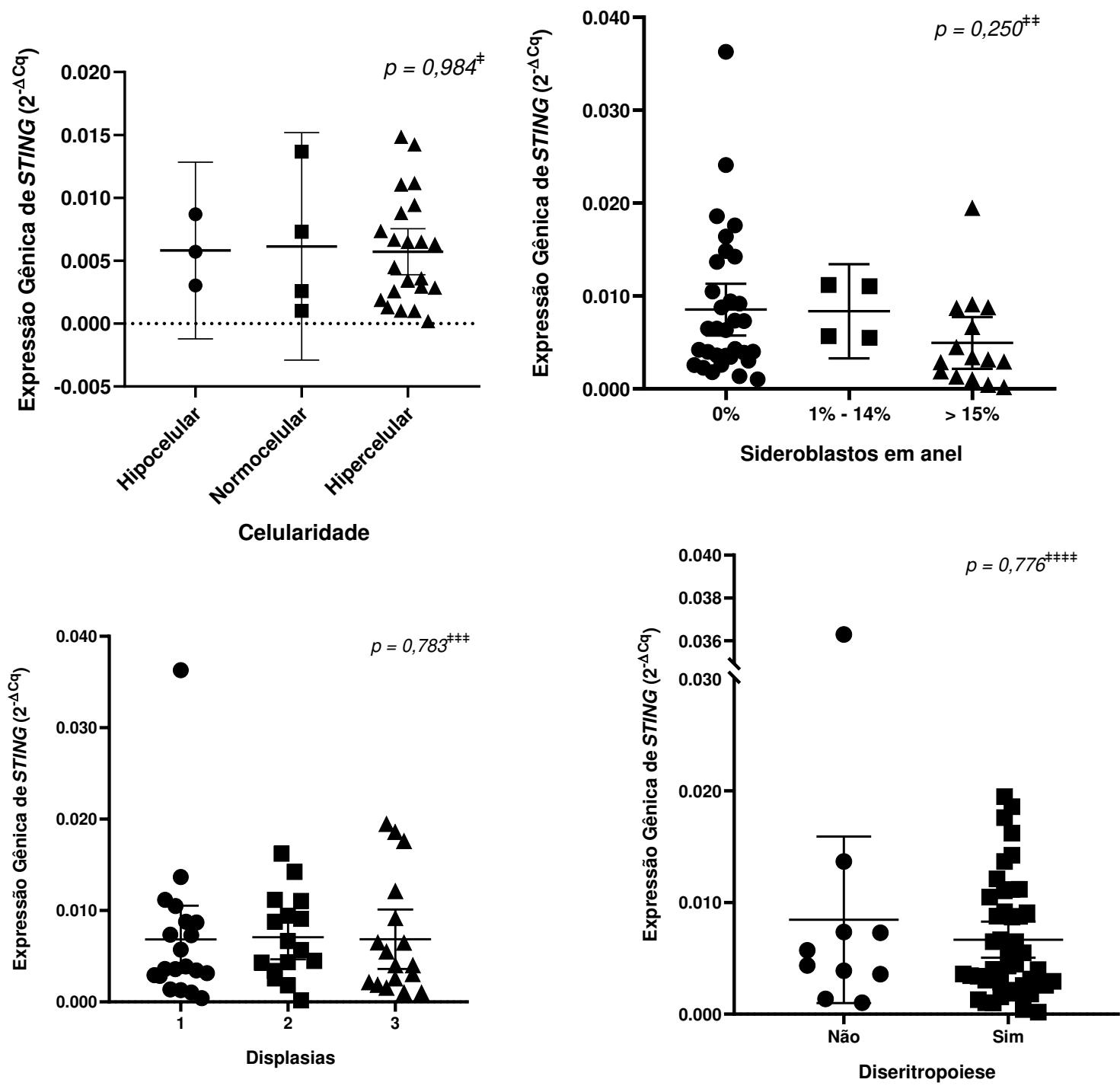
Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Disgranulopoiese	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor####	
Não	29	,006932379	,0040063594	,005408442	,008456317	0,870	0,482	
	26	,006199908	,0036300875	,004733684	,007666132			

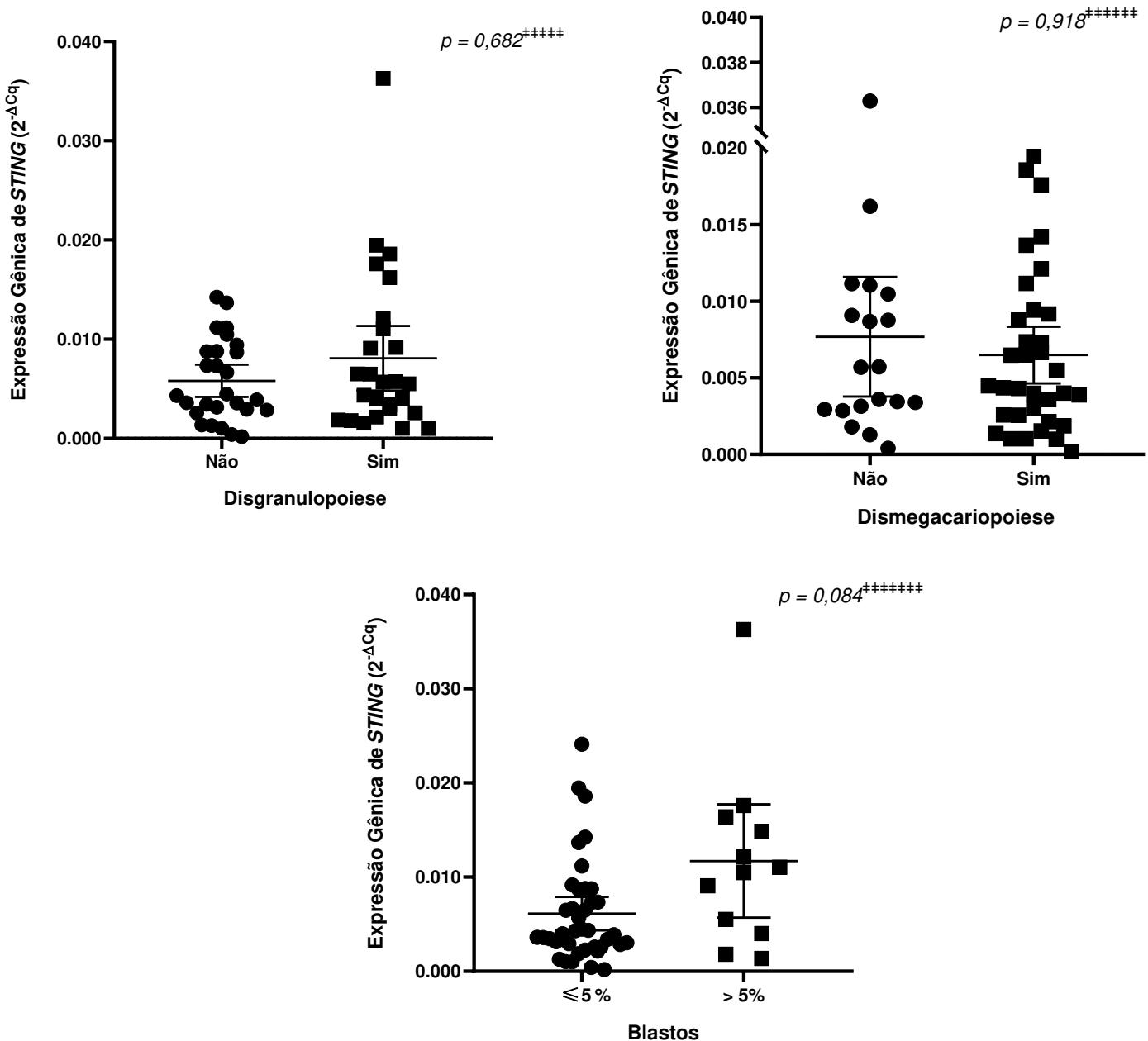
####Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Dismegacariopose	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor####
Não	22	,008289955	,0053689761	,005750476	,010381350	0,019	0,110
Sim	34	,005932615	,0031885847	,004883039	,007151622		

####Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 8 – Níveis de expressão de *STING* em variáveis relacionadas aos achados medulares





Gene STING		Nível de expressão (Expressão Gênica de STING (2 ^{-ΔCq}))						
Celularidade	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova [‡]	Teste de Levene	Tukey
Hipocelular	3	,005815733	,0028265115	-,001205711	,012837177	0,984	0,393	0,995/0,999
Normocelular	4	,006138750	,0056831990	-,002904488	,015181988			0,995/0,982
Hipercelular	23	,005713422	,0042321364	,003883309	,007543535			0,999/0,982

[‡]ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Sideroblasto em anel (%)	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis#
0%	32	,006404600	,0077163134	,005754057	,011318112	0,250
1% - 14%	4	,008369250	,0031881487	,003279819	,013425931	
> 15%	15	,003148800	,0050412961	,002155710	,007739263	

#Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Displasias	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Kruskal-Wallis##
1	3	,003740700	,0078705815	,003162739	,010529831	0,783
2	4	,006170750	,0045676401	,004651670	,009519517	
3	25	,003998700	,0063258258	,003607072	,010111951	

##Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Diseritropoiese	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney###
Não	10	,005031900	,0104302757	,000989380	,015912120	0,776
Sim	43	,004473200	,0051706562	,004976135	,008158721	

##Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Disgranulopoiese	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney####
Não	27	,004308000	,0041042947	,004180565	,007427775	0,682
Sim	26	,005593000	,0080596461	,004829035	,011339758	

##Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

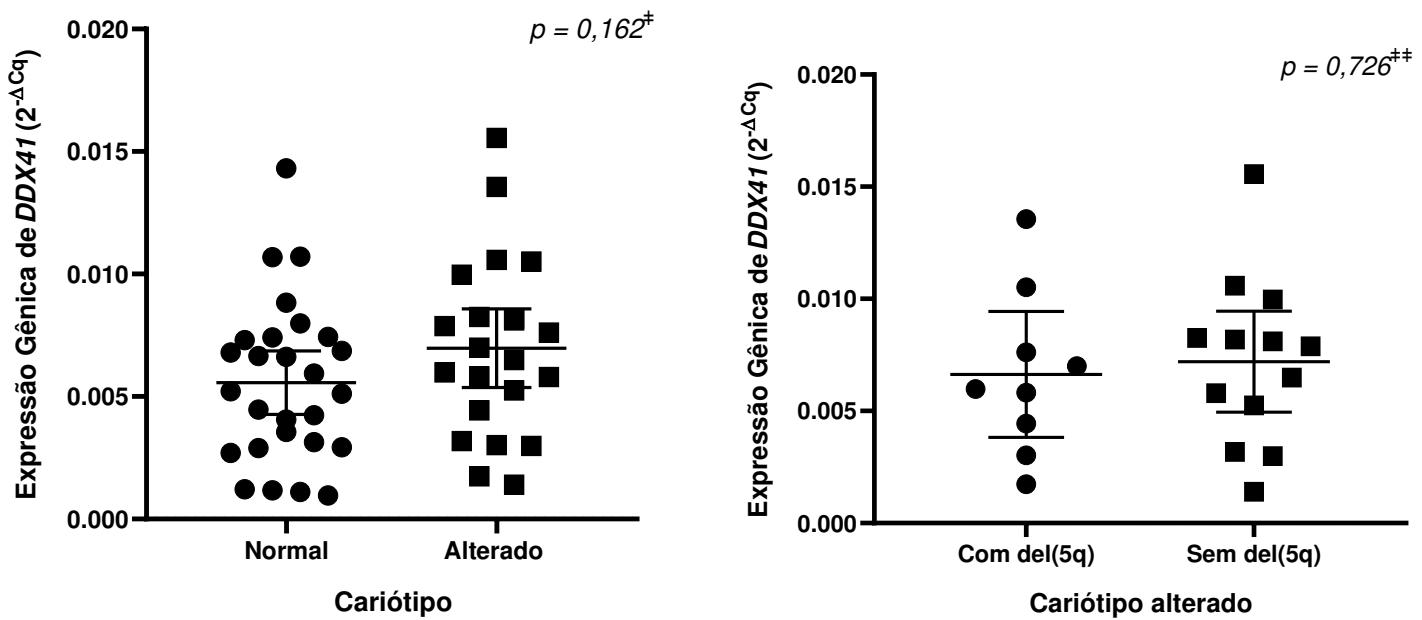
Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Dismegacariopose	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney####
Não	19	,005687100	,0081045858	,003777967	,011590538	0,918
Sim	34	,004412200	,0053123638	,004643667	,008350810	

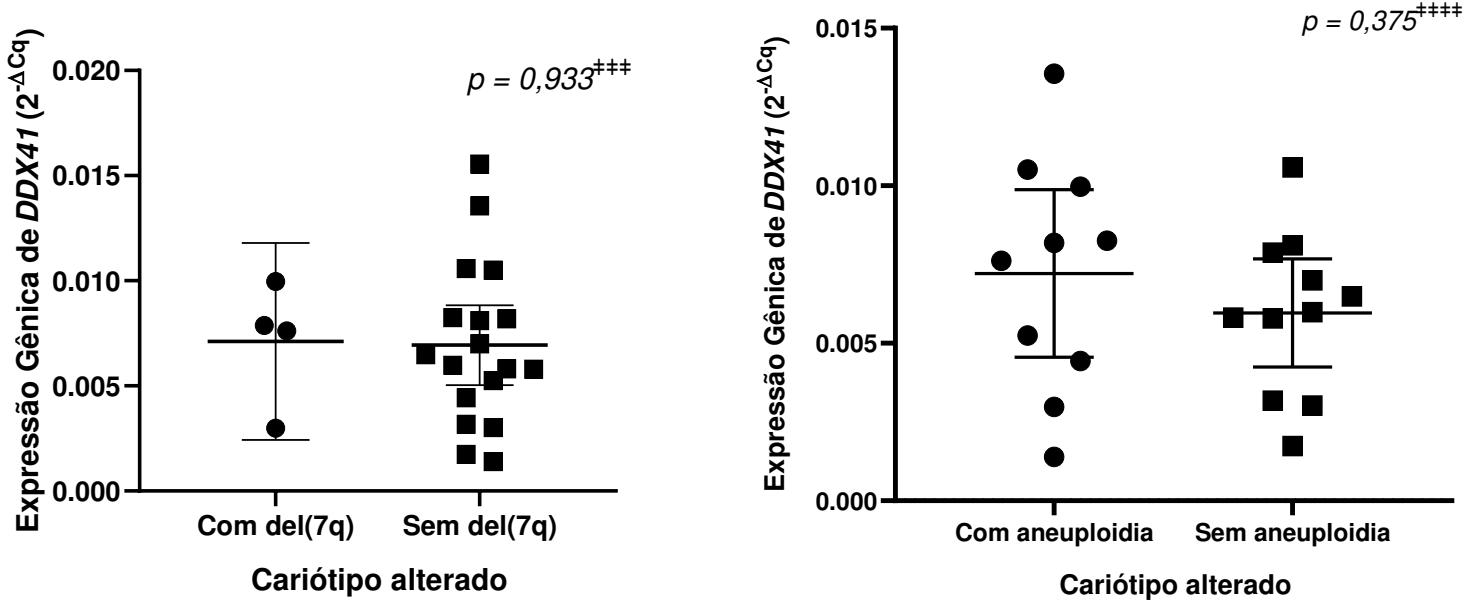
####Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Blastos categorizado em 5%	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney####
$\leq 5\%$	39	,003995100	,0054814207	,004349008	,007902751	0,084
$> 5\%$	12	,010768100	,0094527356	,005704810	,017716773	

####Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos.

Figura 9 – Níveis de expressão de *DDX41* em variáveis relacionadas aos achados citogenéticos





Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
KT Normal x Alterado	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
Normal	27	,005567759	,0032728459	,004273065	,006862454	0,773	0,162
Alterado	22	,006967655	,0036188119	,005363163	,008572146		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
KT Alterado del(5q)	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor‡
Com del(5q)	9	,006630989	,0036572309	,003819792	,009442185	0,932	0,726
Sem del(5q)	13	,007200731	,0037224855	,004951255	,009450206		

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
KT Alterado del(7q)	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor##
Com del(7q)	4	,007110375	,0029468553	,002421271	,011799479	0,505	0,933

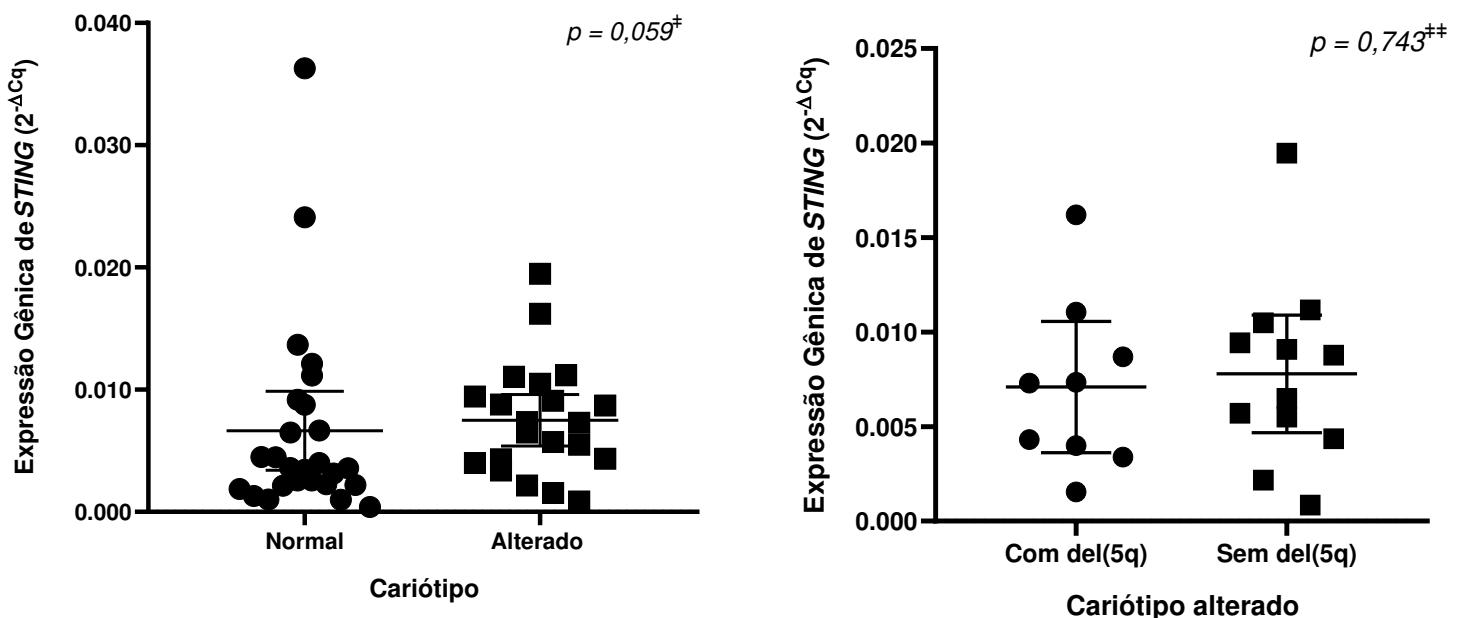
Sem del(7q)	18	,006935939	,0038260742	,005033277	,008838601		
-------------	----	------------	-------------	------------	------------	--	--

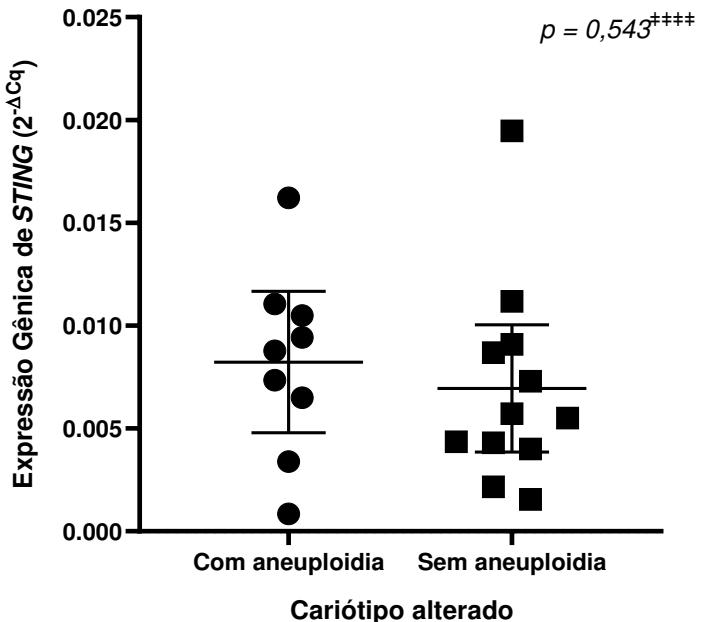
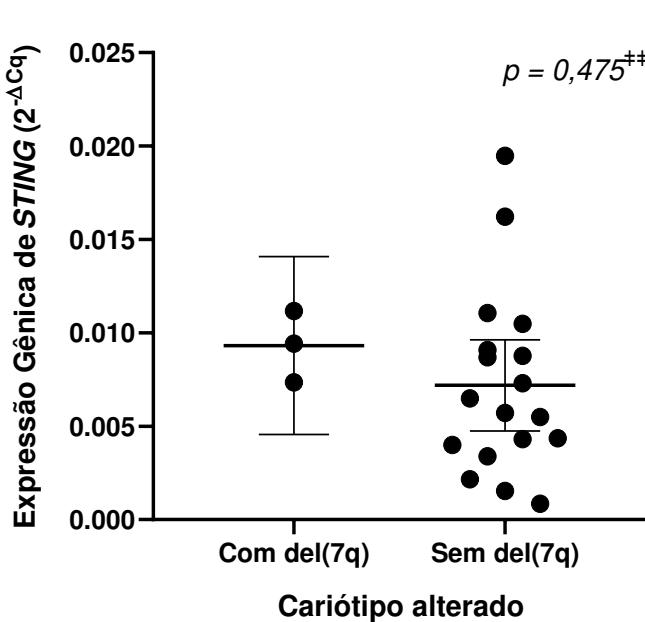
##Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
KT Alterado Aneuploidia	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor##
Com aneuploidia	11	,005961809	,0025544776	,004245688	,007677931	0,187	0,375
Sem aneuploidia		,007215050	,0037151818	,004557369	,009872731		

##Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 10 – Níveis de expressão de *STING* em variáveis relacionadas aos achados citogenéticos





Gene STING		Nível de expressão (Expressão Gênica de STING (2^-ΔCq))					
Cariótipo	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney†	
Normal	26	,003587950	,0079955631	,003404076	,009863032	0,059	
Alterado	21	,007295600	,0046327556	,005382709	,009600319		

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos

Gene STING		Nível de expressão (Expressão Gênica de STING (2^-ΔCq))					
KT Alterado del(5q)	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor#
Com del(5q)	9	,007295600	,0045179207	,003620652	,010566215	0,851	0,743
Sem del(5q)	12	,007634250	,0048939642	,004680598	,010899552		

#Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene STING		Nível de expressão (Expressão Gênica de STING (2^-ΔCq))					
KT Alterado del(7q)	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor##
Com del(7q)	3	,009427500	,0019152567	,004558905	,014074428	0,200	0,475

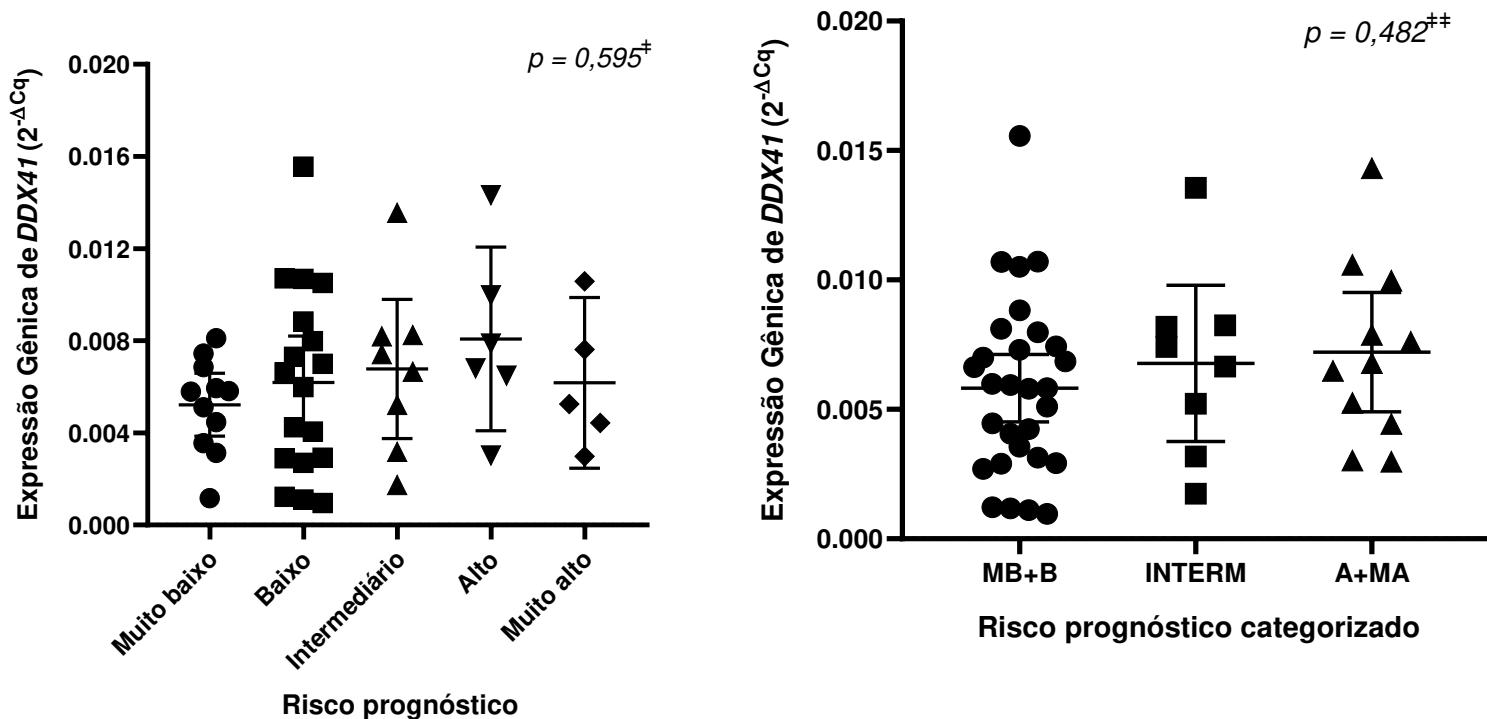
Sem del(7q)	18	,006103200	,0049124867	,004744400	,009630244		
-------------	----	------------	-------------	------------	------------	--	--

##Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
KT Alterado Aneuploidia	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor##
Com aneuploidia	9	,008225211	,0044753332	,003849036	,010033447	0,878	0,543
Sem aneuploidia		,006941242	,0048667819	,004785165	,011665257		

##Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 11 – Níveis de expressão de *DDX41* em relação ao risco prognóstico (IPSS-R)

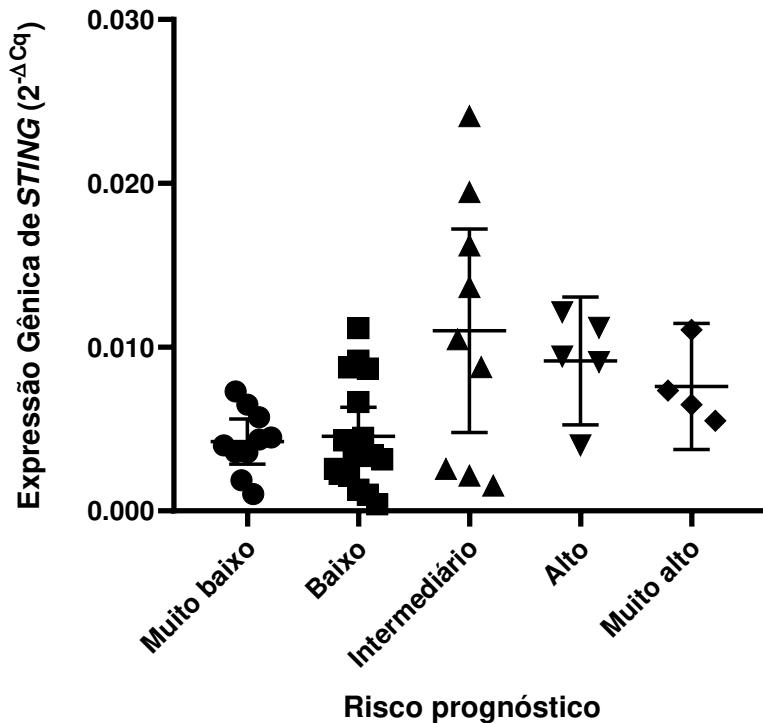


Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Risco Prognóstico (IPSS-R)	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova†	Teste de Levene	Tukey
Muito baixo	11	,005217718	,0020309255	,003853324	,006582112	0,595	0,298	0,949/0,870/0,493/ 0,986
Baixo	18	,006183556	,0040538643	,004167616	,008199495			0,949/0,994/0,776/ 1,000
Intermediário	8	,006775313	,0036123257	,003755333	,009795292			0,870/0,994/0,957/ 0,998
Alto	6	,008076633	,0038018046	,004086884	,012066383			0,493/0,776/0,957/ 0,894
Muito alto	5	,006172100	,0029815611	,002470003	,009874197			0,986/1,000/0,998/ 0,894

†ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))						
Risco Prognóstico (IPSS-R)	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova‡	Teste de Levene	Tukey
Muito baixo + baixo	29	,005817203	,0034173429	,004517316	,007117091	0,492	0,998	0,768/0,495
Intermediário	8	,006775313	,0036123257	,003755333	,009795292			0,768/0,960
Alto + Muito alto	11	,007210936	,0034310335	,004905937	,009515936			0,495/0,960

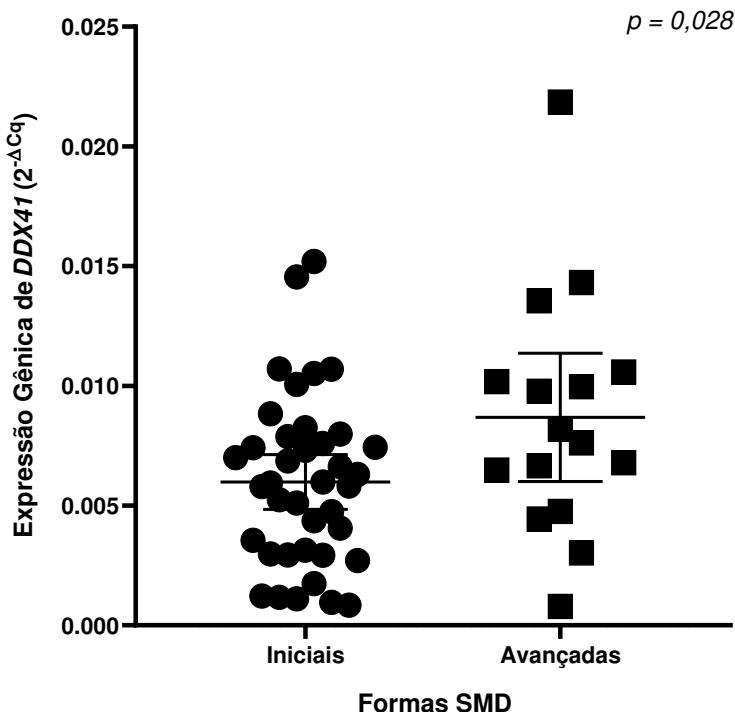
‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

Figura 12 – Níveis de expressão de *STING* em relação ao risco prognóstico (IPSS-R)

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> (2 ^{-ΔCq}))						
Risco Prognóstico (IPSS-R)	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova‡	Teste de Levene	Games-Howell
Muito baixo	10	,004239190	,0019303684	,002858288	,005620092	0,006	0,000	0,998/0,188/0,099/0,242
Baixo	16	,004555531	,0033094224	,002792065	,006318998			0,998/0,228/0,129/0,335
Intermediário	9	,010998678	,0080749752	,004791702	,017205653			0,188/0,228/0,971/0,777
Alto	5	,009161340	,0031440036	,005257544	,013065136			0,099/0,129/0,971/0,909
Muito alto	4	,007598125	,0024230662	,003742486	,011453764			0,242/0,335/0,777/0,909

‡ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas. IC: Intervalo de confiança. Nº: número de casos.

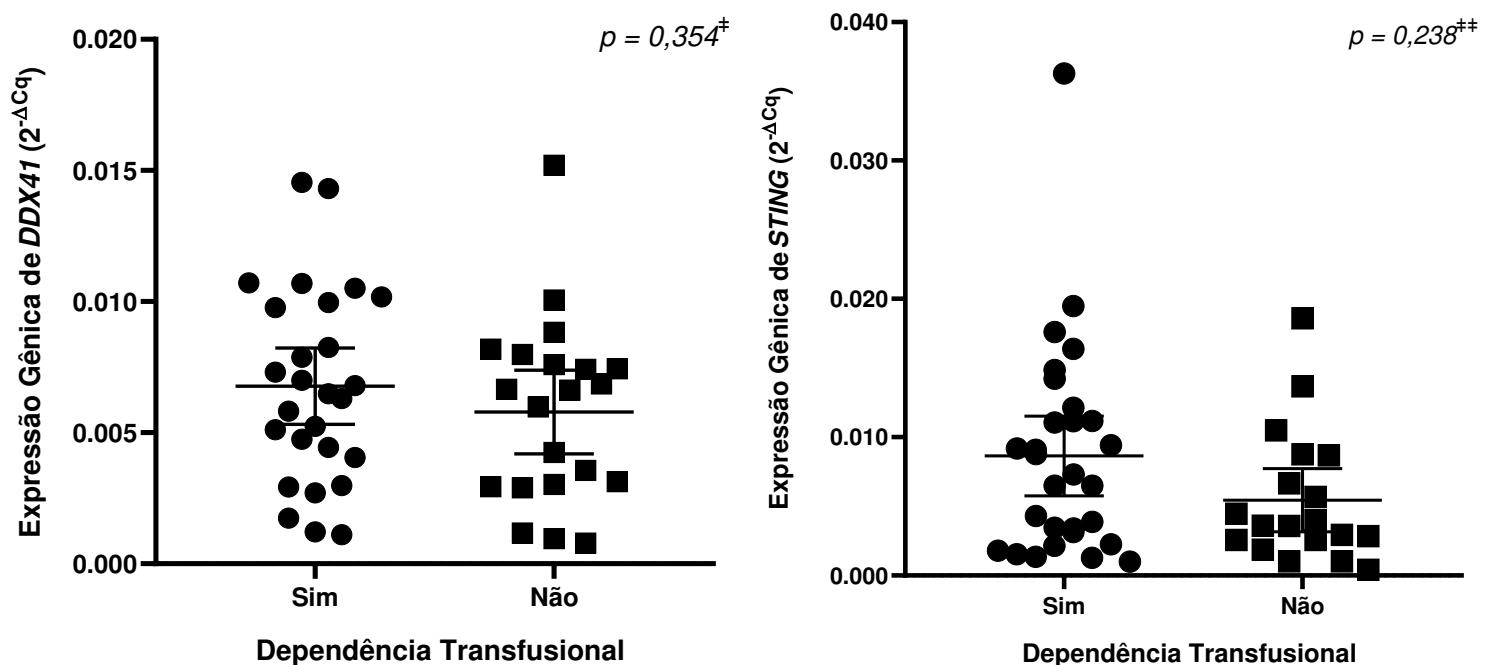
*Apesar de um teste ANOVA dando valor $<0,05$, não foi encontrado significância no pós-teste.

Figura 13 – Níveis de expressão de *STING* em relação a variável Formas SMD sem SMD-DM

Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))					
Formas SMD sem SMD-DM	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
Iniciais	18	,007514672	,0041832834	,005434374	,009594970	0,558	0,464
Avançadas	16	,008684900	,0050291989	,006005029	,011364771		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Figura 14 – Níveis de expressão da variável Dependência transfusional



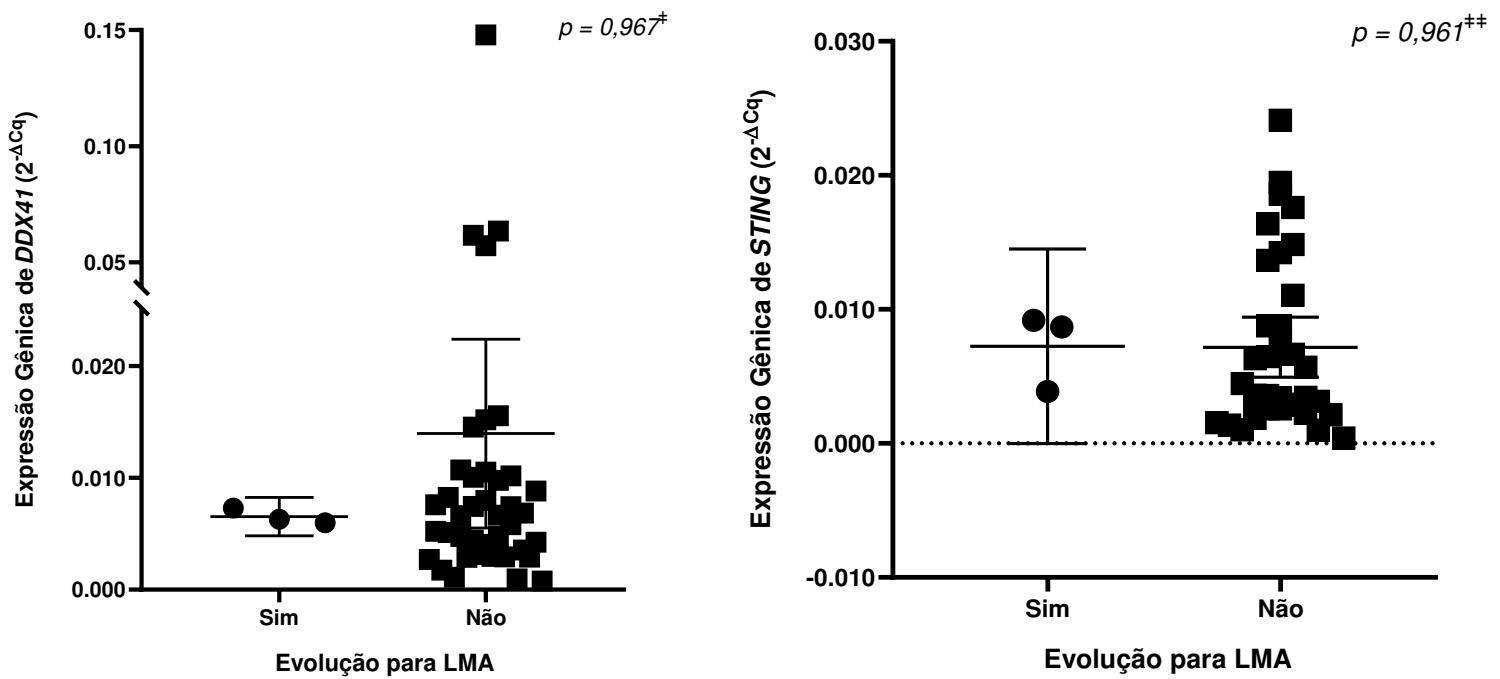
Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> (2 ^{-ΔCq}))					
Dependência Transfusional	Nº	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor†
Sim	27	,006770378	,0036895492	,005310841	,008229915	0,797	0,354
Não		,005787100	,0035077828	,004190376	,007383824		

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> (2 ^{-ΔCq}))				
Dependência Transfusional	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney‡
Sim	29	,007295600	,0075739676	,005762131	,011524097	0,238
Não		,003597700	,0047468982	,003155042	,007730905	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos

Figura 15 – Níveis de expressão da variável Evolução para LMA



Gene <i>DDX41</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>DDX41</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Evolução para LMA	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney†
Sim	3	,006302300	,0006890028	,004819122	,008242278	0,967
Não	40	,006642500	,0263912830	,005523458	,022404142	

†Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos

Gene <i>STING</i>		Nível de expressão (Expressão Gênica de <i>STING</i> ($2^{-\Delta Cq}$))				
Evolução para LMA	Nº	Mediana	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de MannWhitney‡
Sim	3	,008692400	,0029248306	,000016082	,014515282	0,961
Não	34	,004035450	,0064144095	,004941280	,009417467	

‡Mann-Whitney: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. N: número de casos

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES *DDX41* E *STING* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____, _____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo, que corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos,

sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 8 mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

A recoleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise

RISCOS DO PROCEDIMENTO

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadas) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral.

Em caso de dores mais fortes, entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa pelo telefone (85) 981881972.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária, não havendo pagamento de nenhuma forma para os participantes e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

BENEFÍCIOS DA PESQUISA

A presente pesquisa traz como benefício o fato de que estudos que avaliem o perfil de expressão gênica, proteica, metilação, cultura de células, análise do efeito do estresse oxidativo com o objetivo principal de desenvolvimento de novos fármacos para essa doença.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-981881972)** ou com a aluna de graduação **Letícia Rodrigues Sampaio (85-996956997)**

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

____/____/____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

____/____/____

Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE